

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Th. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Prädiktive und prognostische Marker in pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien *in vitro* und *in vivo*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Michael Boch
aus Lindenberg i. Allgäu
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 30. Oktober 2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Patrick Michl

1. Korreferent: PD Dr. Matthias Lauth

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Summary.....	8
3	Einleitung.....	10
3.1	Pankreatische neuroendokrine Neoplasien	10
3.1.1	Funktionell-aktive neuroendokrine Neoplasien des Pankreas.....	14
3.1.2	Funktionell-inaktive neuroendokrine Neoplasien des Pankreas	15
3.2	Klinisch etablierte Zytostatika	16
3.2.1	5-Fluorouracil (5-FU)	16
3.2.2	Dacarbazin (DTIC).....	18
3.3	Potenzielle Biomarker	20
3.3.1	Transkriptionsfaktor CUX1	21
3.3.2	CUX1-regulierte miRNAs	22
3.3.3	Drug-Metabolismus-assoziierte Biomarker	25
3.4	Zielsetzung der Arbeit.....	28
4	Material und Methoden	29
4.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software.....	29
4.1.1	Laborgeräte	29
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	30
4.2	Chemikalien, Reagenzien, Kits, Puffer	32
4.3	<i>In vitro</i> Experimente	33
4.3.1	Zellkultur	33
4.3.2	Gesamtproteinbestimmung.....	34
4.3.3	Auftrennung der Proteine und Proteintransfer	35
4.3.4	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF Membran.....	36
4.3.5	Immundetektion	36
4.3.6	Gesamt-RNA-Isolation aus Zelllysat.....	36
4.3.7	SiRNA-Transfektion	37
4.3.8	CDNA-Synthese	37
4.3.9	MiRNA-Expressionsanalyse	38

4.3.10	MiRNA Multiplex Präamplifikation.....	38
4.3.11	QRT-PCR für miRNA.....	38
4.3.12	Primer für cDNA-Synthese	39
4.3.13	QRT-PCR für mRNA (SyBr Green)	40
4.4	<i>In vivo</i> Experimente	41
4.4.1	Xenograft Mausmodell.....	41
4.4.2	Vorbereitung der Gewebe.....	41
4.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
4.4.4	Immunhistochemie.....	42
4.5	Patientendaten.....	45
4.5.1	Definition klinischer Endpunkte.....	45
4.5.2	Dacarbazin-behandelte Patienten	46
4.5.3	5-Fluorouracil-behandelte Patienten.....	46
5	Ergebnisse.....	47
5.1	CUX1 in der Maus – Xenograft-Experimente	47
5.2	CUX1-Expression in humanen PNEN	52
5.3	CUX1-regulierte miRNA.....	58
5.3.1	MiRNA-Expression in Bon1-Zellen nach CUX1-Überexpression	58
5.3.2	MiRNA-Expression in Bon1-Zellen nach CUX1-Knockdown	62
5.4	CUX1 und Drug-Metabolismus-assoziierte Gene in Bon1-Zellen.....	66
5.5	Expression von Drug-Metabolismus-assoziierten Enzymen und Korrelation zum Therapieansprechen.....	69
5.5.1	MGMT-Expression bei DTIC-behandelten Patienten	69
5.5.2	DPD- und TS-Expression bei 5-FU-behandelten Patienten	73
6	Diskussion	76
6.1	Bedeutung prädiktiver und prognostischer Marker in Zeiten personalisierter Medizin.....	76
6.2	CUX1 als Biomarker	78
6.3	CUX1-regulierte miRNAs.....	82
6.4	Therapieansprechen und Enzymexpression	84
6.4.1	Dacarbazin und MGMT.....	84

6.4.2	5-FU und DPD/TS.....	85
6.5	Limitationen	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Abbildungsverzeichnis.....	105
9	Tabellenverzeichnis	107
10	Abkürzungsverzeichnis.....	108
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	111
	Danksagung	112

1 Zusammenfassung

Bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (PNEN) handelt es sich um seltene Tumoren, die von den endokrinen Zellen des Pankreas ausgehen. Biomarker, welche eine effektive Selektion geeigneter Patienten für bestimmte systemische Chemotherapien ermöglichen, sowie Marker von prognostischer Relevanz für den Therapieverlauf sind jedoch nur unzureichend beschrieben. Daher war das Ziel dieser Arbeit, sowohl *in vitro*, im Xenograft-Mausmodell als auch in humanen Geweben mögliche prognostische und prädiktive Biomarker zu identifizieren und zu evaluieren. Im Fokus stand hierbei der Transkriptionsfaktor CUX1, dessen Genprodukt in malignen Zellen Gene reguliert, die für proliferative, antiapoptotische und motilitätsfördernde Prozesse von Bedeutung sind. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe belegten eine signifikant gesteigerte CUX1-Expression in invasiven humanen Insulinomen. In stabil CUX1-überexprimierenden Bon1-Zelllinien konnten *in vitro* proliferative, antiapoptotische und proangiogene Eigenschaften von CUX1 gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Xenograft-Modell der Maus die tumorfördernden Eigenschaften von CUX1 bestätigt. CUX1-überexprimierende Tumoren zeigten immunhistochemisch eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate. Basierend auf diesen *in vitro* und *in vivo* Befunden im Mausmodell war es ein weiteres Ziel der Arbeit, die prognostische Relevanz des Transkriptionsfaktors CUX1 bei Patienten mit PNEN zu evaluieren, welche als systemische Chemotherapie eine Behandlung mit 5-Fluoruracil (5-FU)- bzw. Dacarbacin (DTIC) erhalten hatten. Eine hohe CUX1-Expression war bei Patienten mit 5-FU-basierter Therapie mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben (PFS) vergesellschaftet. Jedoch war in dieser Kohorte weder zwischen dem Proliferationsindex Ki-67 noch dem Gesamtüberleben eine Korrelation mit der CUX1-Expression zu beobachten.

Hieraus ergab sich als weitere Fragestellung, inwieweit CUX1, unabhängig von den Effekten auf die Proliferationsrate, Resistenzmechanismen gegen zytotoxische Chemotherapien induziert. Hierzu wurden potenziell CUX1-abhängige miRNAs und Enzyme, die in den Metabolismus der Chemotherapeutika eingreifen können, untersucht. Es konnten jedoch keine miRNAs identifiziert werden, die klar durch CUX1 reguliert werden. Ebenso wenig zeigten die Enzyme Thymidylatsynthase (TS), Dihydropyrimidin-

Dehydrogenase (DPD) und O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) eine CUX1-abhängige Regulation.

Aufgrund von Literaturdaten, dass die letztgenannten Enzyme für andere Tumorentitäten prognostische und prädiktive Aussagekraft besitzen, wurde deren Expression und Relevanz auch an Gewebeproben einer PNEN-Kohorte evaluiert. Die erhöhte DPD-Expression war signifikant mit einer erhöhten objektiven Ansprechrate (ORR) korreliert, zeigte allerdings keine Verlängerung des mittleren progressionsfreien Überlebens (mPFS), während die TS neben einem signifikant gesteigerten mPFS auch einen Trend zu einer besseren Krankheitskontrolle aufwies. Die MGMT hingegen war bei Patienten, die eine DTIC-basierte Therapie erhalten hatten, ohne prognostischen oder prädiktiven Wert.

Die potentiellen Biomarker, welche in dieser Arbeit beschrieben wurden, sollten in prospektiven Studien weiter evaluiert werden.

2 Summary

Pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEN) form a rare and heterogenous group of tumors that originate from the endocrine cells of the pancreas. Biomarkers that allow an effective selection of patients for individualized systemic chemotherapy, as well as markers of prognostic relevance for the course of the disease however are still lacking. Therefore, the aim of this work was to identify and evaluate potential biomarkers *in vitro*, in a xenograft mouse model and in human tissues. The transcription factor CUX1, which is known to regulate genes implicated in proliferation, resistance to apoptosis and cell migration mechanisms was in focus of this study. Previous investigations performed by our group showed that the CUX1 expression is significantly increased in invasive human insulinomas. Stably overexpressing CUX1 Bon1 cells demonstrated *in vitro* the pro-proliferative, anti-apoptotic and pro-angiogenic properties of CUX1 *in vitro*.

In the current work, these tumorigenic features of CUX1 were confirmed using a xenograft mouse model. CUX1 overexpressing tumors significantly modulated proliferation and apoptosis detected via immunohistochemistry.

Based on these *in vitro* and *in vivo* data, another objective was to evaluate the relevance of the transcription factor CUX1 in patients with PNEN who had received a 5-fluorouracil (5-FU)- or dacarbazine (DTIC)-based chemotherapy. In patients with a 5-FU-based therapy a strong immunohistochemical CUX1 expression was associated with a significantly shorter progression free survival (PFS). However, neither the proliferation index Ki-67 nor overall survival correlated with CUX1 expression.

Searching for proliferation-independent mechanisms mediating CUX1-induced resistance to chemotherapy, potential CUX1-associated miRNAs and drug metabolism-associated enzymes were evaluated. However, no miRNAs were identified that were conclusively are regulated by CUX1. Likewise, the enzymes thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) exhibited no CUX1-dependent regulation. Since literature reports suggest that these enzymes could have prognostic and predictive significance in other tumor entities, the expression levels were evaluated in tissue samples of a PNEN cohort. The increased DPD expression was significantly correlated with the increased objective response rate (ORR). TS was associated with prolonged progression free survival (PFS) and showed a non-significant trend towards prolonged

disease control rate (DCR). In contrast, MGMT showed no prognostic or predictive value in patients who received a DTIC-based therapy.

Potential biomarkers, as described in this study, should be further evaluated in prospective trials.

3 Einleitung

3.1 Pankreatische neuroendokrine Neoplasien

Bei neuroendokrinen Neoplasien (NEN) handelt es sich um epitheliale Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung. Ursprünglich sollte der Begriff „neuroendokrine Neoplasie“ die Hypothese widerspiegeln, dass sich diese Tumoren von Neuralleistenzellen ableiten, was jedoch mehrfach widerlegt wurde (Auböck und Höfler, 1983; Höfler *et al.*, 1983). Daten aus Europa und den USA zeigen, dass es sich bei NEN mit einer Inzidenz von 2,5-5/100000 um eine seltene Erkrankung handelt. Oberg *et al.* stellten fest, dass die NEN nur etwa 0,5% aller Malignome ausmachen (Oberg und Castellano, 2011). In den letzten Jahren zeigt sich eine stetig ansteigende Inzidenz, was auf die verbesserten diagnostischen Maßnahmen und auf die in der Bevölkerung wachsende Sensibilität für Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen ist (Modlin *et al.*, 2008).

Bei den NEN handelt es sich um eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Tumorentitäten, welche jedoch folgende Charakteristika teilen:

Ätiologisch entwickeln sich Neuroendokrine Neoplasien aus Geweben, die embryologisch dem Neuroektoderm oder dem Entoderm entstammen (Starker und Carling, 2009). Immunhistochemisches und neuroendokrines Differenzierungsmerkmal ist die Expression gemeinsamer Zellmarker wie Chromogranin A (in Sekretgranula), Neuroten-spezifische Enolase (NSE) und Synaptophysin (in der Membran präsynaptischer Vesikel) (Freudenberg *et al.*, 2009). Weitere phänotypische Gemeinsamkeit ist die Expression von Somatostatin Rezeptoren. Die fünf Rezeptorisoformen (SSR1-5) können diagnostisch oder therapeutisch gezielt genutzt werden. Mittels SMS-Szintigraphie oder der Gallium68-DOTATOC-PET-CT können SSR-exprimierende NEN diagnostisch dargestellt werden. Therapeutisch dienen die SSR als Angriffspunkt für Somatostatin-rezeptoranaloga oder die Pepdirezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie (PRRT).

Neuroendokrine Neoplasien können sich in jedem Organ des Körpers manifestieren und besitzen im Allgemeinen eine gute Prognose. Das Fünfjahresüberleben der NEN ist neben der Lokalisation und dem Ursprungsorgan im Wesentlichen vom Stadium des Tumors bei Beginn der Erkrankung abhängig: 93% bei lokalem Befund, 74% bei regionaler Ausbreitung und 19% bei Metastasierung (Taal und Visser, 2004; Jann *et al.*, 2011; Strosberg *et al.*, 2011; Rindi *et al.*, 2012). Ursprungsorgane, in denen diese Tumoren am häufigsten auftreten sind neben der Lunge vor allem Organe des Verdauungstrakts (Modlin *et al.*, 2008; Modlin *et al.*, 2007). Die im Verdauungstrakt auftretenden Tumoren bilden die Gruppe der gastro-entero-pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN). Abbildung 1 zeigt die ansteigende Inzidenz neuroendokriner

Neoplasien in den Jahren 1973 bis 2003. In allen Ursprungsorganen ist dieser Effekt signifikant, zudem geht aus der Abbildung die Häufigkeitsverteilung der NEN hervor. Hierbei wird ersichtlich, dass NEN der Lunge die größte Gruppe darstellt. Die Summe der übrigen dargestellten Manifestationsorte bildet die Gruppe der GEP-NEN (Yao *et al.*, 2008).

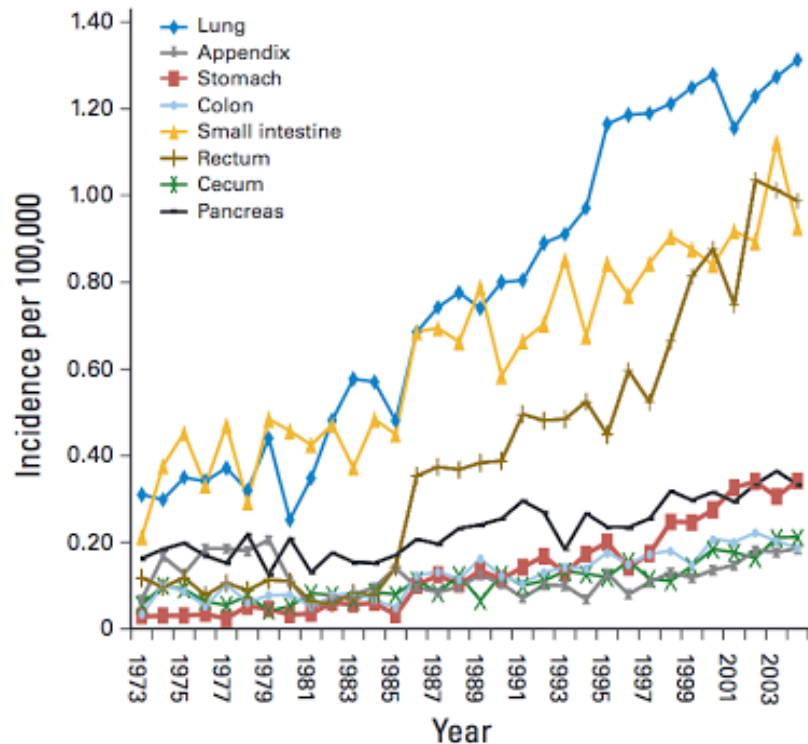


Abb. 1: Inzidenz neuroendokriner Neoplasien aufgeschlüsselt nach Ursprungsorgan (Yao *et al.*, 2008)

Die GEP-NEN können nach embryologischem Ursprung, nach den WHO Leitlinien und nach TNM klassifiziert werden. Aus embryogenetischen Gesichtspunkten wurden die GEP-NEN 1963 in foregut, midgut und hindgut Tumoren eingeteilt (Williams und Sandler, 1963; Oberg, 2002; Plöckinger *et al.*, 2004). Diese Einteilung ist heute nur noch bedingt relevant, da nicht alle heute bekannten GEP-NEN erfasst werden (Kloppel *et al.*, 2007). Die WHO Leitlinien teilen, ungeachtet des Ursprungsorgans, in gut differenzierte neuroendokrine Tumoren G1/G2 sowie schlecht differenzierte neuroendokrine Tumoren NET G3 und Karzinome NEC G3 ein (inklusive klein- und großzelliger Karzinome sowie Mischformen, dem „Mixed Adenoneuroendocrine Carcinoma“ MANEC) (Rindi, 2010). Tabelle 1 zeigt die WHO Klassifikation, bei der sich das Grading (G1-G3) nach Mitosezahl oder dem Anteil der Ki-67 positiv gefärbten Zellen richtet.

Tab. 1: Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien nach WHO (Rindi, 2010)

Grading	Mitosezahl/10 HPF*	Ki-67 (%)
G1	< 2	<2
G2	2-20	3-20
G3	>20	> 20

*HPF=high power field

Weiterhin gibt es die organspezifische TNM Klassifikation, welche zudem noch andere Faktoren wie Größe, Angioinvasion und Metastasierung berücksichtigt (Tan und Tan, 2011; Klöppel *et al.*, 2004; Pavel *et al.*, 2012).

Da in dieser Arbeit pankreatische Neuroendokrine Neoplasien (PNEN) untersucht wurden, soll im Folgenden auf diese eingegangen werden. Wie Abbildung 2 zeigt, sind pankreatische neuroendokrine Neoplasien makroskopisch in der Regel gut abgrenzbar und weisen im Vergleich zum exokrinen Pankreas eine graugelbe Verfärbung auf.

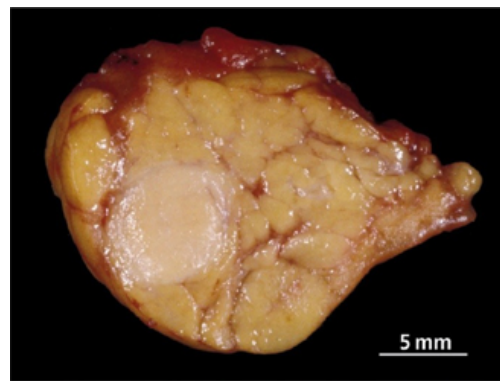


Abb. 2: Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor des Pankreas: Pankreas mit scharf begrenztem solidem Tumor (Klöppel).

Das histomorphologische Spektrum der neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas ist besonders groß: solide-nestartige, trabekuläre, pseudoazinäre, pseudoglanduläre oder gyriforme Wachstumsmuster sind möglich (Perren *et al.*, 2009). Abbildung 3 zeigt die Unterschiede zwischen einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC, links) und einer pankreatischen neuroendokrinen Neoplasie (rechts). Das PDAC zeigt Tumordrüsen mit atypischer Epithelien, ausgeprägten Zellatypien und Kerngrößen-schwankungen. Die Drüsenlumina enthalten nekrotische Tumorzellen. Insbesondere bei gut- und mäßiggradig differenzierten Tumoren liegen die Tumorzellinfiltrate in reichlich desmoplastischem Stroma (Pfeil). Das PNEN präsentiert hochdifferenzierte kleinzellige Tumorformationen, angeordnet in inselartigem Wachstumsmuster (Ormanns, 2014).

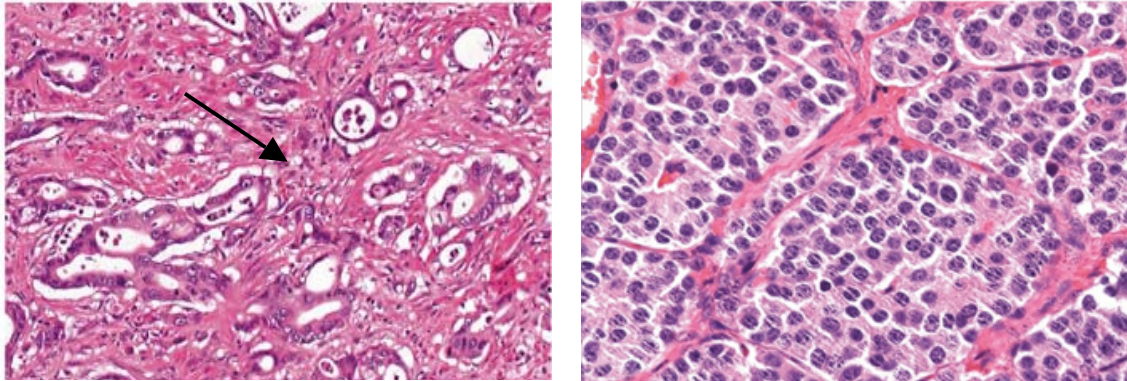


Abb. 3: Links: **pankreatisches duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)**. Der Pfeil zeigt das für das PDAC typische desmoplastische Stroma. Rechts: **neuroendokrine Neoplasie des Pankreas** (Ormanns, 2014).

Der größte Anteil pankreatischer neuroendokriner Neoplasien entsteht sporadisch durch spontane Mutationen (Leotlela *et al.*, 2003). Seltener können sie im Rahmen von hereditären Tumorsyndromen auftreten. Dazu zählen das Multiple Endokrine Neoplasie Syndrom (MEN1), Neurofibromatose Typ1 (Morbus Recklinghausen) oder Von-Hippel-Lindau Syndrom. Dabei treten die Neoplasien häufig schon im jüngeren Alter mit oftmals multiplen Manifestationsorten auf. Tumorbilologisch hat vor allem die genetische Entschlüsselung familiärer NEN-Syndrome neue Erkenntnisse erbracht, wobei sich die dort identifizierten Gene auch für das sporadische Auftreten als relevant herausgestellt haben. Bis zu 68% der sporadischen PNEN und 78% der gastrointestinalen Karzinoide weisen einen Loss of Heterozygosity (LOH) des Chromosom 11q13 auf (Jakobovitz *et al.*, 1996; Perren *et al.*, 2004). Neben der Tumorbilologie ist das Wachstumsverhalten der GEP-NEN abhängig von der Lokalisation, der lokalen Tumorausdehnung und dem Grading. Alle neuroendokrinen Pankreastumoren besitzen, mit Ausnahme neuroendokriner Mikroadenome, Malignitätspotential. Als prädiktiv für maligne Entartung haben sich neben Muskularis- und Lymphgefäßinvasion auch die Tumorgöße (> 20mm) und eine hohe Wachstumsfraktion (>2/10 HPF) herausgestellt (Wang *et al.*, 2011). Die Invasivität und Infiltration von Nachbarorganen kann zu lokaler Symptomatik führen. PNEN sind in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, Hormone zu produzieren, was zu systemischen Symptomen führen kann. Man spricht hierbei von sogenannten funktionell-aktiven Tumoren. Bei ca. einem Viertel der Tumoren handelt es sich um hormoninaktive, nicht-funktionelle Tumoren. Auf die unterschiedlichen Subgruppen der PNEN wird im nun folgenden Abschnitt eingegangen.

3.1.1 Funktionell-aktive neuroendokrine Neoplasien des Pankreas

Etwa ein Drittel der funktionell-aktiven, hormonproduzierenden Tumoren der Bauchspeicheldrüse sind Insulinome. Es handelt sich dabei um Tumoren der Insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans-Inseln, dem endokrinen Anteil des Pankreas. Insulinome können in jedem Alter auftreten und haben ihren Häufigkeitsgipfel zwischen dem 40.-60. Lebensjahr. Sie finden sich ausschließlich im Pankreas und treten dort in der Regel mit einem Tumordurchmesser von 0,5 bis 3 cm und solitär auf. 90% sind benigne. Bei multiplen, synchronen oder metachronen Insulinomen muss eine hereditäre Genese (MEN1) ausgeschlossen werden (Borazan *et al.*, 2015). Klinisch ist das Insulinom durch Whipple-Trias charakterisiert mit rezidivierenden hyperinsulinämischen Spontanhypoglykämien, neuroglykopenischen Zeichen und einer sofortigen Besserung der Symptomatik nach Gabe von Glucose.

Beim Gastrinom kommt es nach Entartung multipotenter Stammzellen zu konstitutiver Gastrinproduktion. Circa 60% der Gastrinome sind maligne (Jensen, 1999). Die Symptomatik, die durch ein Gastrinom hervorgerufen wird, wird in Anlehnung an die beiden Erstbeschreiber von 1955 Zollinger-Elison-Syndrom genannt (Zollinger und Ellison, 1955). Dabei handelt es sich um Ulzerationen im oberen Gastrointestinaltrakt, einer Magensäurehypersekretion und einem Tumor im sogenannten Gastrinomdreieck, gebildet vom absteigenden Duodenum und dem Pankreaskopf.

Neben den oben genannten funktionellen Tumoren gibt es noch weitere, jedoch extrem seltene funktionelle Tumoren der Bauchspeicheldrüse. Beim VIPom produzieren die Tumoren vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP). Sie können als Inselzellhyperplasie, Nicht- β -Inselzell-Adenom oder -Karzinom oder als kleinzelliges Bronchialkarzinom auftreten. Die Symptomatik besteht in ausgeprägten wässrigen Diarrhöen, Hypokaliämie, Hypotension und Azidose. Beim Glukagonom handelt es sich um einen glukagonproduzierenden Pankreastumor, der sich durch klinisch auffällige Hauterscheinungen (Erythema necroticans migrans) zeigen kann. Weitere seltene funktionelle Tumorentitäten des Pankreas sind Somatostatinome, Serotonin-produzierende Karzinoidtumoren, ACTHom/CRFom, GRFom, PTH-like-ome.

3.1.2 Funktionell-inaktive neuroendokrine Neoplasien des Pankreas

60-80% der NEN des Pankreas sind nicht-funktionell (Rindi *et al.*, 2012). Sie werden aufgrund fehlender Hormonproduktion erst spät durch raumforderndes Tumorstadium bedingte, unspezifische Beschwerden (abdominelle Schmerzen, eine tastbare Resistenz, Gewichtsverlust) symptomatisch. Bei hereditären Tumorsyndromen wie der MEN-1 können die Tumoren multipel vorliegen.

Für die Diagnose ist die Abgrenzung zum Pankreasadenokarzinom wichtig. Neben dem unterschiedlichen Manifestationsalter und der klinisch meist verschiedenartigen Präsentation gibt es auch bildmorphologische Anhaltspunkte, die bei der Differenzierung beider Tumorentitäten helfen. In CT und MRT stellen sich pankreatische NEN meist als „umschriebene, solide, verdrängend wachsende, glatt begrenzte Raumforderungen“ dar (Holzapfel *et al.*, 2011). Primären neuroendokrinen Neoplasien sind, ebenso wie ihre Metastasen, klassischerweise hypervaskularisiert, während Adenokarzinome, im Gegensatz zu ihrem Umgebungsgewebe, häufig hypovaskularisiert sind (Kann, 2006; Rickes *et al.*, 2006). In der arteriellen und portalvenösen Phase kommt es infolge der Hypervaskularisation zu einer Kontrastmittelanreicherung (Holzapfel *et al.*, 2011). Neben der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie existieren auch andere hochentwickelte bildgebende Verfahren wie das Gallium-68-DOTATOC-PET/CT, das zum Auffinden von Mikrometastasen besonders geeignet ist (Stumpp *et al.*, 2013). Erhöhte Serumkonzentrationen der Tumormarker Chromogranin A (CgA) oder pankreatisches Polypeptid (PP) können die Diagnose „Neuroendokrine Neoplasie“ stützen.

3.2 Klinisch etablierte Zytostatika

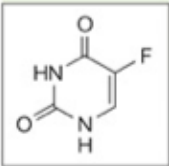
Eine Möglichkeit zur Behandlung pankreatischer neuroendokriner Neoplasien im metastasierten Stadium ist die systemische Chemotherapie. Medikamente, die zum Einsatz kommen, sind 5-Fluorouracil und Dacarbazin. Biomarker, die ein Ansprechen des Tumors auf diese Medikamente vorhersagen können, sollten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Deshalb werden die Medikamente und deren Metabolismus im Folgenden vorgestellt.

3.2.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-Fluorouracil (5-FU) zählt zu den weltweit am häufigsten und am breitesten eingesetzten onkologischen Medikamenten (Diasio und Harris, 1989b). Es gehört zur Gruppe der synthetischen Antimetabolite und wird als Fluoropyrimidin-Analog bei unterschiedlichsten Tumorentitäten angewendet. 5-FU ist eine inaktive Form, die enzymatisch zu unterschiedlichen aktiven Metaboliten umgewandelt werden kann und so an verschiedenen Stellen der RNA- und DNA-Synthese sowie an der Thymidylat-Synthetase ansetzt. Fluorouracil wird *in vivo* enzymatisch zu 5-Fluororidinmonophosphat (F-UMP) synthetisiert, welches seinerseits wiederum zu den pharmakologisch aktiven Metaboliten FdUTP und FUTP umgesetzt wird (siehe Abb. 4). Die klinisch pharmakologische Wirkung der Fluoropyrimidinen zeichnet sich durch ein stark variables Ansprechen und große Unterschiede in der Nebenwirkungsrate bei verschiedenen Patienten aus.

Der antiproliferative Effekt von 5-FU geht im Wesentlichen auf drei Mechanismen zurück (Matuo *et al.*, 2009; Diasio und Harris, 1989a; Schilsky, 1998).

1. Einbau von 5-Fluorouracil Triphosphat (5-FUTP) in RNA
(Kanamaru *et al.*, 1986; Ghoshal und Jacob, 1994; Santi und Hardy, 1987; Randerath *et al.*, 1983).
2. Einbau von 5-Fluorodesoxyuracil Triphosphat (5-FdUTP) in die DNA
(Parker und Stivers, 2011)
3. Hemmung der Thymidylat-Synthetase (TS) durch 5-Fluorodesoxyuracil Monophosphat (5-FdUMP) (Bijnsdorp *et al.*, 2007)



5-Fluorouracil (5-FU; siehe Strukturformel) wird intrazellulär zu drei Substanzen metabolisiert: Fluorodesoxyuridin-Monophosphat (FdUMP), Fluorodesoxyuridin-Triphosphat (FdUTP) und Fluorouridin-Triphosphat (FUTP). Die Umwandlung zu Fluorouridin-Monophosphat (FUMP) erfolgt entweder direkt mit der Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT), die Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) als Kofaktor nutzt oder indirekt über die aufeinander folgende enzymatische Aktivierung mittels Uridin-Phosphorylase (UP) und Uridin-Kinase (UK). FUMP wird dann zum Diphosphat phosphoryliert, was anschließend durch eine weitere Phosphorylierung zum aktiven Triphosphat oder durch die Ribonukleotid-Reduktase (RR) zu Fluorodesoxyuridin Diphosphat (FdUDP) verstoffwechselt wird. Auch FdUDP kann entweder phosphoryliert oder dephosphoryliert werden, was so die beiden Metaboliten FdUTP bzw. FdUMP generiert. Ein alternativer Aktivierungsweg beinhaltet die Konversion von 5-FU zu Fluorodesoxyuridin (FUDR), was über die Thymidin Kinase phosphoryliert wird. Die Dihydropyrimidin Dehydrogenase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von 5-FU zu Dihydrofluorouracil (DHFU) in gesunden ebenso wie in Tumorzellen (Longley *et al.*, 2003).

Klinisch-therapeutisch besitzt 5-FU in Kombinationstherapie mit Streptozotocin (STZ), gemäß den ENETs-Leitlinien von 2012 besonderen Stellenwert bei der Behandlung gut differenzierter (G1 und G2) PNEN mit progressiver, nicht resektabler, hepatischer oder systemischer Metastasierung (Pavel *et al.*, 2012). Dieser Goldstandard gilt sowohl für funktionell-aktive als auch für funktionell-inaktive PNEN. Der Großteil der Studien zu dieser Kombinationstherapie deuten auf Ansprechraten zwischen 30% und 40% hin (Moertel *et al.*, 1980; Eriksson *et al.*, 1990b). Moertel *et al.* sprechen in ihrer Erhebung von 1992 sogar von bis zu 69% (Moertel *et al.*, 1992).

3.2.2 Dacarbazin (DTIC)

Dacarbazin (DTIC), biochemisch auch 5-(3,3-Dimethyltriazen)imidazol-4-Carboxamid genannt, ist ein Imidazol-Carboxamid-Derivat, welches strukturell an Purine angelehnt ist (vgl. Abbildungen 5 und 6).

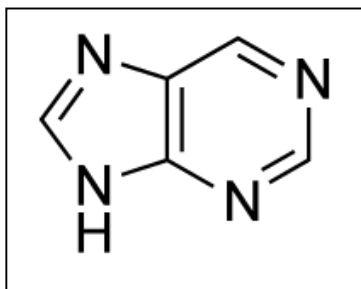


Abb. 5: Purin

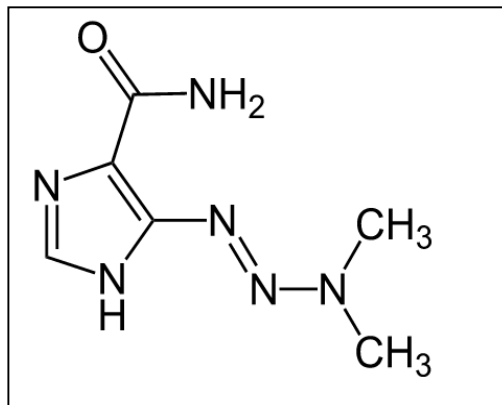


Abb. 6: Dacarbazin (DTIC)

Bei diesem Medikament handelt es sich um das Prodrug eines Zytostatikums, welches seine phasenunspezifische, antineoplastische Wirkung durch DNA-Alkylierung entfaltet. Dosislimitierend ist die Myelosuppression. Insbesondere zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms, des Weichteilsarkoms und bei Morbus Hodgkin wird dieses Medikament eingesetzt. Auch bei metastasierten neuroendokrinen Neoplasien kann das Medikament entsprechend der ENETs Konsusleitlinien zum Einsatz kommen (Falconi *et al.*, 2012). Zur Wirksamkeit von DTIC existieren einige Daten, beispielsweise als wirksame first-line Therapie bei zuvor unbehandelten Inselzelltumoren (Ramanathan *et al.*, 2001) oder bei metastasierten Karzinoiden (Bukowski *et al.*, 1994). Daneben wird das Medikament auch als Zweitlinientherapie bei Krankheitsprogression folgend auf eine FU/DOX- oder FU/STZ-Therapie (Sun, 2005) eingesetzt. Initial wird es in der Leber durch mikrosomales Cytochrom P450 in einer Demethylierungsreaktion zu 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid metabolisiert und damit aktiviert (Marchesi *et al.*, 2007;

Amirmostofian *et al.*, 2013). Abbildung 7 zeigt, dass der aktive Metabolit in der Lage ist, Guanin Derivate am Stickstoff der Position 7 oder am Sauerstoff der Position 6 zu methylieren. Daraus resultiert eine fehlerhafte Basenpaarung von O⁶-Methylguanin mit Thymin. Dies wiederum hat ein inkorrektes Ablesen der DNA im Zellzyklus sowie Zellzyklusarretierung zur Folge.

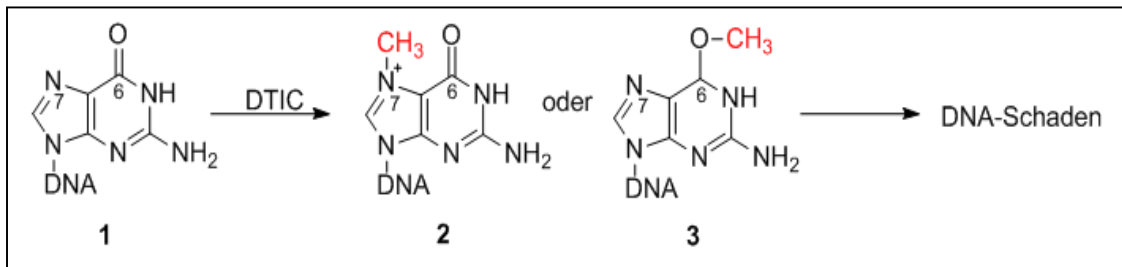


Abb. 7: DTIC methyliert DNA-Basen

Eine DNA-Base (1) kann am Stickstoff der Position 7 (2) oder am Sauerstoff der Position 6 (3) methyliert werden. Dies führt zum DNA-Schaden.

3.3 Potenzielle Biomarker

Mit den Fortschritten der modernen Molekularbiologie und neuen technologischen Errungenschaften erschloss sich in den letzten Jahrzehnten den Lebenswissenschaften das Feld der genom- oder biomarkerbasierten Medizin, die nun auch zunehmend in der Klinik Anwendung findet. Dabei sollen Erkrankungswahrscheinlichkeiten, Therapieerfolge und Prognosen anhand individueller genetischer Merkmale genauer vorhergesagt werden. Besondere klinische Relevanz haben Biomarker im Bereich der Pharmakogenetik. Die zentrale Frage dabei ist: Von welcher Therapie kann der individuelle Patient profitieren? Hintergrund ist die auf molekularer Ebene unterschiedliche genetische Ausstattung, die bei scheinbar gleicher Erkrankung zu unterschiedlichem Ansprechen oder gar zu Pharmakoresistenzen führt. Immer kleiner werdenden Subgruppen innerhalb einer vormals undifferenzierten Diagnose, beispielsweise Brustkrebs, kommt eine individuell stratifizierte Behandlung zuteil. Bei einigen Tumorentitäten werden bereits routinemäßig Mutationstests bestimmter Genorte in der klinischen Praxis angewendet, um eine Therapieeffektivität vor Therapiebeginn besser abschätzen zu können. Dies ist der Fall beim Mammakarzinom (HER2/neu), beim kolorektalem Karzinom (Kras) oder beim Gastrointestinalen Stromatumor (cKit, PDGFRA). Somit können empirische Therapieschritte, die nicht immer effektiv sind, jedoch in der Regel Nebenwirkungen und Kosten verursachen, reduziert oder gar übersprungen werden (Häussler und Albrecht, 2007). Ein prädiktiver Faktor ist ein Biomarker, welcher es erlaubt, die Effizienz kostspieliger innovativer Therapien durch Selektion geeigneter Patienten zu erhöhen und so Nebenwirkungen bei anderen Patienten zu senken. Prognostische Marker erlauben Rückschlüsse auf den Verlauf oder die Heilungschancen einer Krankheit. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem in Fallserien retrospektiv Tumorgewebe von NEN-Patienten auf potenzielle Biomarker hin untersucht und mit dem klinischen Ansprechen korreliert. Wegen der langjährigen Expertise in Behandlung und Erforschung neuroendokriner Tumoren hat das interdisziplinäre Zentrum für Neuroendokrine Tumoren am Universitätsklinikum in Marburg die Zertifizierung „Europäischen Exzellenzzentrum“ durch die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) erhalten. Die Gewebe- und die klinische Datenbank, insbesondere der neuroendokrinen Tumoren des gastro-entero-pankreatischen Systems, wurden zur Erfassung der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse genutzt.

3.3.1 Transkriptionsfaktor CUX1

Der Transkriptionsfaktor CUX1 wurde als Regulator unterschiedlicher Zellzyklusprozesse beschrieben und war in dieser Arbeit zentrales Protein, dessen Funktion und mögliche Rolle als Biomarker in PNEN tiefergehend untersucht wurde.

CUX1/CUTL1/CDP gehört zur Familie der Homöobox Transkriptionsfaktoren und ist evolutionär hochkonserviert. Als transkriptionell wirksames Protein ist CUX1 an unterschiedlichen Prozessen der Differenzierung und Entwicklung undifferenzierter Säugerzellen beteiligt (Skalnik *et al.*, 1991; Ai *et al.*, 1999). Zellzyklusabhängig kommt es durch alternatives Spleißen oder proteolytische Spaltung zur Expression unterschiedlicher Isoformen, die alle nach ihrem Molekulargewicht benannt werden (Goulet *et al.*, 2004; Goulet *et al.*, 2006; Rong Zeng *et al.*, 2000). Die am besten charakterisierte 200 kDa schwere Isoform beinhaltet vier DNA-Bindungsdomänen (Harada *et al.*, 1994). Die DNA-Bindungsaffinität und die daraus resultierende transkriptionelle Aktivität von CUX1 ist abhängig von der Anzahl der vorhandenen DNA-Bindungsdomänen, die innerhalb der Isoformen variieren. Die p200 full-length Isoform reprimiert transkriptionelle Vorgänge, wohingegen kürzere Isoformen neben der Repression auch die Aktivierung von Genen bewirken können. Beide Mechanismen können durch direkte DNA-Interaktion oder Rekrutierung Histon-modifizierender Enzyme vermittelt sein (Kim *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Nishio und Walsh, 2004). Die Überexpression von CUX1 wurde in verschiedenen soliden Tumoren einschließlich des Pankreaskarzinoms nachgewiesen (Moon *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2003; Michl *et al.*, 2005; Ripka *et al.*, 2007; Ripka *et al.*, 2010). Dabei reguliert CUX1 in malignen Zellen Gene, die für proliferative, antiapoptotische und motilitätsfördernde Prozesse von Bedeutung sind.

Die erhöhte Expression der p75 und p110 Isoformen setzt Mechanismen der Invasion und Zellmotilität in Gang (Kedinger *et al.*, 2009). Zellmotilität und Invasivität CUX1-überexprimierender Zellen sind erhöht, während diese beiden Tumorcharakteristika in CUX1-Knockdown Zellen deutlich reprimiert sind (Michl *et al.*, 2005; Kedinger *et al.*, 2009). Die CUX1-vermittelte Repression einiger migrationsinhibierender Gene wurde ebenso wie die Aktivierung migrationsfördernder Gene nachgewiesen (Kedinger *et al.*, 2009). In CUX1-überexprimierenden Zellen führt die Hochregulation antiapoptotischer Proteine im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen, zu verzögerter Apoptose (Ripka *et al.*, 2010). Auch die Angiogenese in Tumorgewebe wird durch die Überexpression von CUX1 stimuliert, was eine wichtige Säule der Karzinogenese und des Tumorstwachstums darstellt (Michl *et al.*, 2005).

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe belegten, dass sich ebenfalls eine starke CUX1-Expression in humanen Insulinomen findet (Krug *et al.*, 2014). Im sogenannten RIP1-Tag2 Maus Modell (Expression des Onkogens T-Antigen unter der Kontrolle des Rat Insulin Promoters, Hanahan, 1985) korrelierte die CUX1-Expression sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene mit der Entstehung von invasiven Insulinomen. Mit der Etablierung zweier stabil überexprimierender CUX1-Klone in Bon1-Zellen konnte die Arbeitsgruppe auch *in vitro* die proliferativen, antiapoptotischen und proangiogenen Eigenschaften von CUX1 in neuroendokrinen Zelllinien demonstrieren (Krug *et al.*, 2014).

3.3.2 CUX1-regulierte miRNAs

Bei der Frage, wie die Effekte von CUX1 vermittelt werden, rückten miRNAs – auch wegen ihrer Anwendbarkeit als Biomarker – in den Fokus.

MicroRNAs (miRNAs, miRs) sind 19-25 Nukleotid lange, einzelsträngige, nicht kodierende RNA Moleküle, die evolutionär hochkonserviert sind (Chen und Rajewsky, 2007). Sie spielen bei der transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation der Genexpression eine bedeutende Rolle (He und Hannon, 2004) und haben somit einen nicht unerheblichen Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung (Dostie *et al.*, 2003), Proliferation (Reinhart *et al.*, 2000) und Apoptose (Bartel, 2004; Xu *et al.*, 2003). Sind miRNAs alteriert, kann es zur zellulären Dysregulation kommen, was insbesondere für Krebserkrankungen wesentliche Auswirkungen hat (Lu *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2003; Calin *et al.*, 2004; Metzler *et al.*, 2004). MiRNAs können sowohl als Protoonkogene als auch als Tumorsuppressoren fungieren (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

Bis zur reifen miRNA werden die Vorläufertranskripte in einem komplexen mehrstufigen Pathway prozessiert. Die für miRNA-kodierenden Gene werden durch eine doppelstrangspezifische RNAase III transkribiert, wodurch die sogenannte *primary microRNA* (pri-miRNA) entsteht (Quarles *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2004). Dieses Primärtranskript kann eine Länge von mehreren tausend Nukleotiden besitzen. DGCR8, ein doppelstrangbindendes Protein, und die nukleäre RNase Drosha bilden gemeinsam einen Mikroprozessor-Komplex, welcher die weitere Prozessierung in eine ca. 70 Basenpaar langes precursor microRNA (pre-miRNA) bewirkt (Lee *et al.*, 2003). Die pre-miRNA liegt nun intranukleär in der charakteristischen stem-loop Form vor. Die nukleäre Ausschleusung geschieht durch Bildung eines ternären Komplexes mit dem Transportprotein Exportin-5 und unter Hydrolyse von RanGTP (Lund *et al.*, 2004). Im Zytoplasma werden die doppelsträngigen pre-miRNAs durch die RNase III Dicer und das

dsRNA-bindende Protein TRBP erkannt und in ca. 20 Nucleotid lange RNAs umgewandelt (Zhang *et al.*, 2004). Die Prozessierungsmaschinerie trennt die beiden komplementären Stränge. Nur einer der beiden wird in ein sogenanntes miRNP (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*) eingebaut, welcher dem Ribonukleoproteinkomplex (RISC) stark ähnelt, der bei siRNA-vermittelten RNA-Interferenz Pathways von entscheidender Bedeutung ist (Mourelatos *et al.*, 2002). Die biologischen Wirkmechanismen der miRNA sind noch nicht endgültig geklärt und werden derzeit in der Fachwelt kontrovers diskutiert.

Wird der zur miRNAs komplementäre mRNA-Strang durch miRNPs erkannt, kommt es zur Bindung der miRNA mit dem 3'UTR der mRNA. In Abhängigkeit der Komplementarität und der daraus resultierenden Stabilität der Bindung führt die Interaktion zu unterschiedlichen Effekten. Translation kann vor und nach der Initiation beeinflusst werden (Pillai, 2005). Ein direkter miRNA-vermittelter Effekt kann beispielsweise die Inhibition der Translationsinitiation sein, in dem der miRSC Komplex die Ribosomenassoziation verhindert. Neben der Translationsrepression kann die miRNA auch mRNA-supprimieren, indem das mRNA-Transkript abgebaut, deadenyliert oder in einen Processing body (P-body) abtransportiert wird. Im P-body wird die Ziel mRNA von der Translationsmaschinerie entfernt, degradiert oder für den weiteren Gebrauch aufbewahrt. Der hier beschriebene Prozessierungszyklus der miRNAs ist in Abbildung 8 gezeigt.

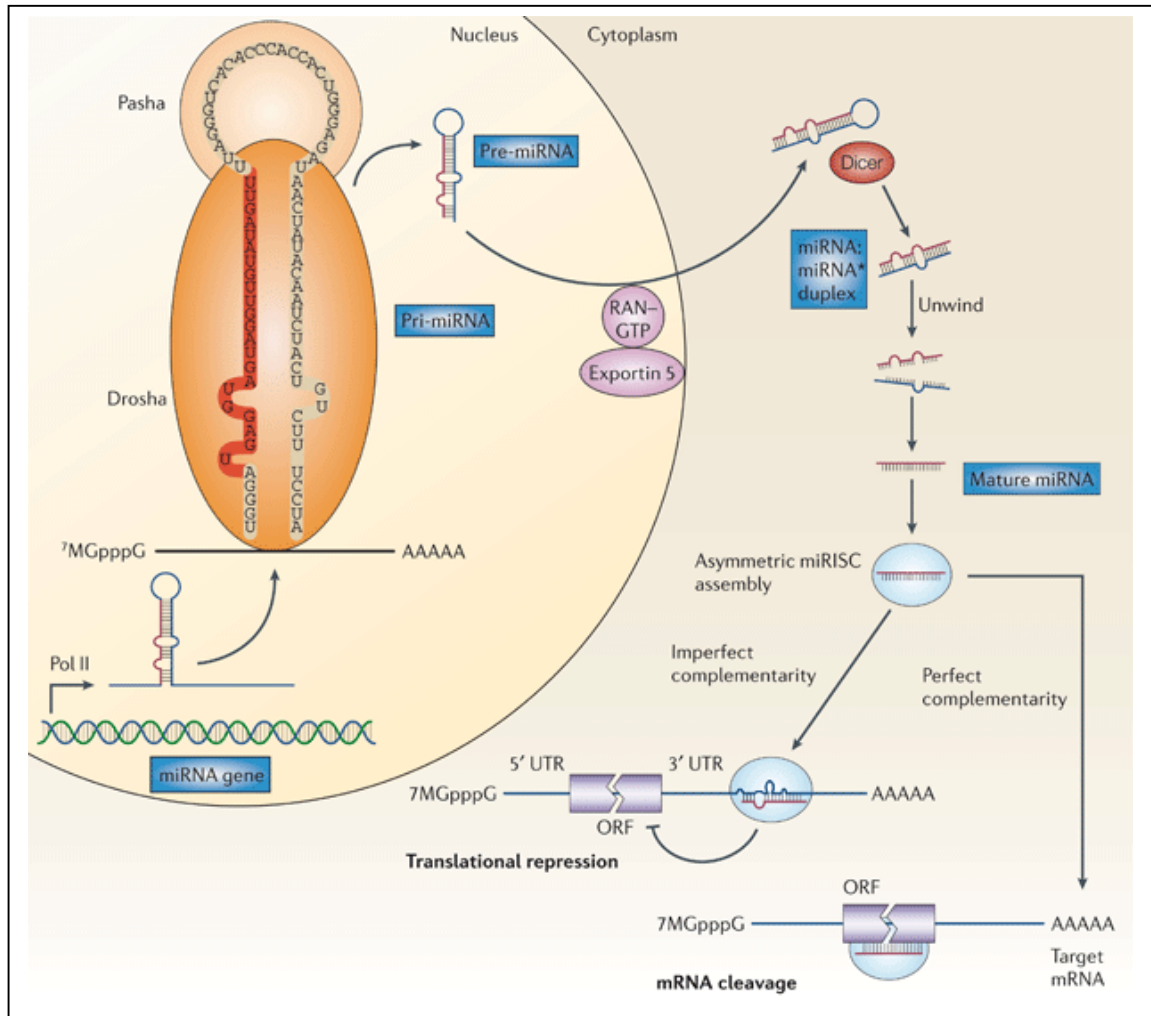


Abb. 8: Übersicht der Prozessierung von miRNAs:

Zunächst werden im Rahmen der mehrschrittigen Prozessierung bis hin zur reifen miRNA lange RNA Vorläufertranskripte gebildet. Diese primary miRNA (pri-miRNA) beinhalten Hairpinstrukturen mit unvollständiger Basenpaarung. Diese pri-miRNAs werden in kürzere precursor miRNA (pre-miRNA) geschnitten, katalysiert durch einen Mikroprozessor aus Drosha, dem RNase III Enzym und DGCR8. Nach dem Export ins Cytoplasma wird enzymatisch mittels Dicer ein 19-25 Nukleotid langer miRNA duplex gebildet. Der Führungsstrang wird in einen Proteinkomplex (RISC) eingebaut. In Abhängigkeit von der Komplementarität zur Ziel-mRNA führt der RISC zur translationalen Repression oder mRNA-Abbau (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

3.3.3 Drug-Metabolismus-assoziierte Biomarker

3.3.3.1 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und DTIC

Das O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gen (Chromosom 10q26) kodiert für das AGT-Protein (Alkylguanin Alkyltransferase), ein als Reparaturmechanismus bekanntes Enzym, welches sowohl Tumor- als auch gesunde Zellen vor Alkylierung durch Chemotherapeutika (wie 5-FU) schützt. Abbildung 9 zeigt, dass die MGMT an Position 6 methyliertes Guanin (3) wieder „reparieren“ kann (1)

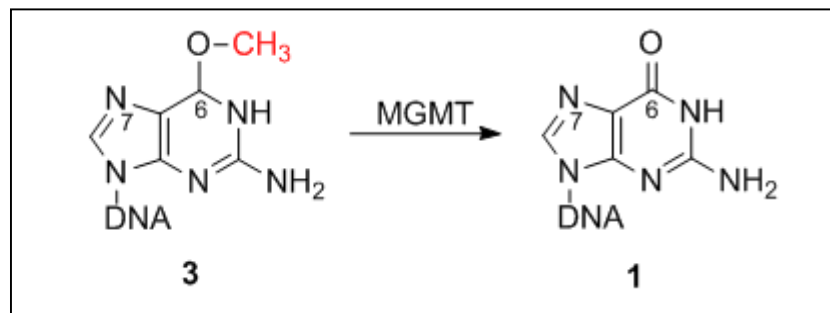


Abb. 9: Wirkweise von MGMT

Die MGMT kann über epigenetische Mechanismen reguliert werden (Hegi *et al.*, 2005). Der MGMT-Gen Promotor wird beispielsweise hypermethyliert, wodurch die transkriptionsinitiierenden Faktoren blockiert werden und die Genaktivität supprimiert wird (Herrlinger *et al.*, 2006; Esteller *et al.*, 2000). Dabei bleibt die DNA-Sequenz unverändert. Besonders in der neuroonkologischen Forschung wurde herausgefunden, dass Patienten mit epigenetisch ge-„silence“-tem MGMT in der Behandlung des Glioblastoms mit Temozolomid, einem Abkömmling des DTIC, einen Überlebensvorteil haben (Stupp *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2009). Wissenschaftler der Harvard Universität konnten auch bei neuroendokrinen Neoplasien zeigen, dass die Expressionshöhe von MGMT mit dem Ansprechen auf Chemotherapie korreliert, was diese Arbeit für PNEN zu reproduzieren versuchte (Kulke *et al.*, 2009).

Dennoch ist der klinisch-therapeutische Stellenwert zur Detektion von MGMT auf Protein-, mRNA- oder Methylierungsebene in NEN bislang unzureichend untersucht und daher sind die bis dato erworbenen Kenntnisse zur Korrelation zum klinischen Ansprechen sehr limitiert (Chan *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2007; Welin *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2013).

3.3.3.2 Thymidylat-Synthase (TS) und 5-FU

Die Thymidylat-Synthase (TS) katalysiert als Schlüsselenzym die reduktive Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP). dTMP ist essentiell für die DNA-Biosynthese (Longley *et al.*, 2003). Das Enzym erhält den für die DNA-Reparatur und Synthese notwendigen Pool an essentiellen Thymidylat-Derivaten aufrecht. Das 36 kDa schwere Protein besteht aus zwei Untereinheiten und ist als Homodimer aktiv. dUMP bindet mit höherer Affinität als das natürliche Substrat dUMP in das katalytische Zentrum des Enzyms und bildet dort einen stabilen ternären Komplex, was die dTMP Synthese inhibiert (Santi *et al.*, 1974). Zum Zelltod führt der fehlende Bestand von dTMP, vor allem das veränderte dATP/dTMP Verhältnis (Houghton *et al.*, 1995).

Pharmakoresistenz gegen das Pyrimidinanalogon 5-FU kann durch eine überschüssige Synthese dieses Enzyms verursacht werden. In verschiedenen Studien wird ein hoher Expressionsspiegel der TS mit einem negativen prognostischen Effekt diskutiert. Untersuchungen gibt es beim Mammakarzinom (Pestalozzi *et al.*, 1997), bei Hals-Kopf Tumoren (Johnston *et al.*, 1997), beim Kolorektalen Karzinom (Ciaparrone *et al.*, 2006b), und beim Pankreaskarzinom (Hu *et al.*, 2003). Auch für neuroendokrine Neoplasien liegen bereits Daten vor (Nagasaki *et al.*, 2010; Ceppi *et al.*, 2008; O'Toole *et al.*, 2010b; Huang *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wird die TS als Biomarker zur Responseprädiktion diskutiert. Hinsichtlich potenzieller Nebenwirkungen einer 5-FU-basierten Chemotherapie wäre es ein Ziel, TS als prädiktiven Marker für den Erfolg einer solchen Therapie auch für das Pankreas-NEN zu etablieren.

3.3.3.3 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) und 5-FU

Die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) katalysiert den geschwindkeitsbestimmenden ersten Schritt im Katabolismus der Pyrimidine. Dieses Schlüsselenzym reguliert nicht nur den Abbau natürlich vorkommender Pyrimidine wie Uracil und Thymidin, sondern auch den Abbau des Fluoropyrimidin 5-FU (Lu *et al.*, 1992; Diasio und Johnson, 1999). Somit beeinflusst DPD entscheidend die Verfügbarkeit und damit die Pharmakokinetik dieses Chemotherapeutikums und ist für viele der schwankenden Therapieeffekte von 5-FU verantwortlich (Diasio, 1998b). Am extremsten werden die schwankenden Therapieeffekte im Rahmen der hereditären autosomal rezessiven Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Defizienz deutlich (van Kuilenburg, 2004). Bei dieser Erkrankung kann eine 5-FU-Therapie lebensbedrohliche toxische Effekte entwi-

ckeln. Um die Pharmakokinetik von 5-FU zu verbessern, wurden bereits Medikamente entwickelt, welche die DPD-Aktivität modulieren (Kubota, 2003).

Die immunhistochemisch nachweisbare Expressionshöhe von DPD in Tumoren hat sich bereits in mehreren Studien als prognostischer oder prädiktiver Parameter bestätigt, beispielsweise bei der adjuvanten 5-FU-Therapie des fortgeschrittenen Kolorektalen Karzinoms (Dukes C) (Oi *et al.*, 2004). Auch die kombinierte Beurteilung von TS und DPD wird von einigen Autoren vorgenommen, was zu besserer Vorhersagekraft für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben führt (Ciaparrone *et al.*, 2006a). Auch für neuroendokrine Neoplasien liegen bereits Daten für beide Enzyme vor. Diese sind jedoch in ihrer Aussage nicht konsistent, vor allem deshalb nicht, weil sie sich auf unterschiedliche Primärgewebe der NEN beziehen, darunter auch Lunge und großzellige NEN (LCNEC) (Nagasaki *et al.*, 2010; Ceppi *et al.*, 2008; O'Toole *et al.*, 2010a; Lee *et al.*, 2014; Monica *et al.*, 2009).

3.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen neuroendokrine Neoplasien hinsichtlich ihrer Tumorbilogie und dem Ansprechen klassischer zytostatischer Therapien untersucht werden. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung von CUX1 und CUX1-regulierter miRNAs als möglichen prognostischen bzw. prädiktiven Markern für das Ansprechen auf Chemotherapien an primären Gewebeproben. Zusätzlich sollen weitere mögliche prognostische bzw. prädiktive Marker, die den Chemotherapie-Metabolismus modulieren, sowie deren mögliche Abhängigkeit von CUX1 untersucht werden. Die Experimente gliedern sich somit in einen zellbiologischen Teil zur Charakterisierung von CUX1 und CUX1-abhängigen miRNAs in NEN-Zelllinien sowie in einen immunhistochemischen Teil von Gewebeproben mit Korrelation zu klinischen Parametern. Die Ziele sind im Einzelnen:

1. Welchen Einfluss hat die Überexpression des Transkriptionsfaktors CUX1 in einem Bon1-Xenograft Modell der Maus?
2. Können in der neuroendokrinen Tumorzelllinie Bon1-definierte miRNAs als CUX1-abhängig identifiziert und validiert werden?
3. Ist die Expression von potenziellen Biomarkern MGMT, TS und DPD abhängig vom Chemoresistenz-vermittelten Transkriptionsfaktor CUX1?
4. Korreliert die Expression des Reparaturenzyms MGMT mit dem klinischen Ansprechen auf DTIC?
5. Korreliert die Expression der mit dem 5-FU-Metabolismus assoziierten Enzyme Thymidylat Synthase und Dihydropyrimidin Dehydrogenase mit dem Ansprechen auf eine 5-FU-basierte Therapie?

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software

4.1.1 Laborgeräte

Tab. 2: Laborgeräte

Produktname	Hersteller
5100 Cryo 1°C Freezing Container “Mr.Frosty”	Nalgene Labware (Wiesbaden, D)
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems (USA)
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments (Hanau, D)
ChemoCam Imager	Intas (Krottendorf, D)
DNA Engine Thermal Cycler Peltier	BioRad (Mexico)
Eismaschine 072816	ZIEGRA (Isernhagen, D)
Feinwaage AE 163	Mettler-Toledo (Giessen, D)
Garer Multi Gourmet	B. Braun (Melsungen, D)
Gefrierschrank Privileg 80 (-20°C)	Quelle GmbH (Burgkunkstadt, D)
Gefrierschrank Hera Freeze (-86°C)	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Heizplatte	Medax (Kiel, D)
Histoturm	Kobe (Marburg, D)
Kühlschrank	Liebherr (Schweiz)
Lichtmikroskop Axio Scope A1	Carl Zeiss (Göttingen, D)
Lichtmikroskop BH-2	Olympus (Japan)
Magnetrührer	IKA (Staufen, D)
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001	Heidolph (Schwabach, D)
Mikrotom RM 2155	Leica (Nussloch, D)
Neubauer-improved-Zählkammer	Roth (Karlsruhe, D)
pH-Meter SR+	Mettler-Toledo (Giessen, D)
Pipetboy	Integra Biosciences (Schweiz)
Pipetten Discovery	Abimed (Langenfeld, D)
Plattformschüttler Unimax 2010	Heidolph (Schwabach, D)
Sterilbank Bench LaminAir HB 2448	Heraeus (Hanau, D)
Tissue Embedding Center	Reichert (Buffalo, USA)
Vortexer MS 1 Mini Shaker	IKA (Staufen, D)
Wasserbad	Medax (Kiel, D)
Zellzählgerät Multiple Pally Denominator	Woodbury (USA)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific (Osterode, D)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Produktname	Hersteller
96 Well Platte für qPCR MicroAMP	Applied Biosystems (USA)
Blotting-Papier; 0,4 mm dick; mittlere Saugfähigkeit	Kobe (Marburg, D)
Combitips (0,2 - 12,5 ml)	Eppendorf (Wesslingen, D)
Cryotubes 2 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Dako Pen	Dako (Hamburg, D)
Deckgläschen	Menzel (Braunschweig, D)
Deckgläser	Menzel (Braunschweig, D)
Falcon Röhrchen 15 und 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Gewebekulturflasche 25, 75 und 175 cm ² CellStar®	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Gewebekulturplatte 24-Well Falcon®	Becton Dickinson (USA)
Gewebekulturplatte 6-, 12- und 48-Well	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Handschuhe	VWR (Darmstadt, D)
Latexhandschuhe Nobaglove	Noba (Wetter, D)
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Mikrotomklingen	Feather (Japan)
Objektträger	Menzel (Braunschweig, D)
Objektträger mit Mattrand	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Objektträger Super Frost Plus	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Parafilm „M“ Laboratory Film	American National Can (USA)
Petrischalen, 92 x 16 mm (ohne Nocken)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipetten 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipetten 5 / 10 / 50 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µl Diamond®	Gilson (USA)
Plastikschalen	VWR (Darmstadt, D)
PVDF-Membran, Immobilon-P ; 0,45 µm Porengröße	Millipore (Darmstadt, D)
Reagiergefäß 1,5 und 2 ml	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Reaktionsgefäße 0,5 / 1 / 2 ml	Eppendorf (Wesseling, D)
SafesealTips Premium 10, 200, 1000 µl	Biozym (Hessisch, Oldendorf D)
Serologische Pipette 2 und 25 ml CellStar®	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

Serologische Pipette 5, 10 und 50 ml	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Skalpell CUTFIX	B. Braun (Melsungen, D)
Softnitrilhandschuhe Nobaglove	Noba (Wetter, D)
Spritzen 1 ml	Henke Sass Wolf (Tuttlingen, D)
Spritzen 5 ml	B. Braun (Melsungen, D)
Waageschalen	Kobe (Marburg, D)
Zellkulturschalen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Zellschaber; 25 cm Länge	Thermo Scientific (Braunschweig, D)

4.2 Chemikalien, Reagenzien, Kits, Puffer

Alle Chemikalien, Reagenzien und Kits wurden, soweit nicht anders vermerkt, von einer der folgenden Firmen bezogen: BioRad, Dako, Life Technologies, Promega, Qiagen oder Sigma Aldrich.

Tab. 4: Kits

Produktname	Hersteller
TaqMan® PreAmp Master Mix 2X	Life Technologies (USA)
Megaplex™ PreAmp Primer Pool A und B (10X)	Life Technologies (USA)
QIAshredder	Qiagen (Hilden, D)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories CA, USA)

Tab. 5: Puffer

Puffer	„Rezept“
Blockingpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 5 % Milchpulver (w/v) in TBST
DAB	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µl DAB Stock • 1 µl H₂O₂ (30%) • 1450 µl PBS
Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM HEPES pH 7,5 • 150 mM NaCl • 1 mM EDTA • 100 mM NaF • 10 mM Na₄P₂O₇ • 10 % Glycerin • 1 % TritonX-100
PBS Puffer (pH=7,4) für IHC :	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mM KH₂PO₄ • 5 mM Na₂HPO₄ • 150 mM NaCl
TBST:	<ul style="list-style-type: none"> • 140 mM NaCl • 25 mM Tris • 1 % Tween®20 (w/v)
0,1x TE (pH=7,7)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Tris • 1 mM EDTA
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris • 200 mM Glycin • 20 % Methanol
Zitratpuffer (pH=6,0)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Mononatriumcitrat

4.3 *In vitro* Experimente

4.3.1 Zellkultur

4.3.1.1 Material für die Zellkultur

Tab. 6: Material für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12	Life Technologies (USA)
Dulbecco's PBS without Ca^{2+} & Mg^{2+} (1 x)	PAA/GE Healthcare (UK)
FBS (Fetal Bovine Serum) Gold	PAA/GE Healthcare (UK)
Gentamicin (10 mg/ml)	PAA/GE Healthcare (UK)
Trypsin EDTA (1x)	PAA/GE Healthcare (UK)

4.3.1.2 Zelllinien

Alle *in vitro* Experimente wurde mit der humanen pankreatischen neuroendokrinen Tumorzelllinie Bon1 durchgeführt.

Tab. 7: Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Referenz	Kulturmedium
Bon1	Humanes Pankreas	(Parekh <i>et al.</i> , 1994)	DMEM/F-12, 40 µg/ml Gentamycin, 10 % FCS
Bon1 mock	Humanes Pankreas	*	
Bon1 CUX1	Humanes Pankreas	*	

* Transfiziert: Heidi Griesmann, AG Michl, UK Marburg

4.3.1.3 Kultivierung der Bon1-Zellen

Die Kultivierung der Bon1-Zellen erfolgte mit DMEM*/F12 mit 10% fetalem Kälberse-
rum (FCS) und 5 µg/ml Gentamycin. Kulturbedingungen im Brutschrank waren 37°C
bei 5% CO₂. Die Kulturmedien wurden zusammen mit Trypsin EDTA bei 4°C und PBS
bei Raumtemperatur gelagert.

4.3.1.4 Subkultivierung von Zellen

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen bei ca.70-80%iger Konfluenz
passagiert, d.h. verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Nach dem sterilen
Absaugen des Mediums und einem Waschschrift mit 5ml Dulbecco's PBS (1x) ohne
 Ca^{2+} + Mg^{2+} , welches ebenfalls abgesaugt wurde, erfolgte die Zugabe von 2ml Trypsin
EDTA. Dabei dauerte in ca. 2 Minuten im Brutschrank das Trypsin die Zell-Matrix-
Verbindungen an und EDTA löst als Ca^{2+} -Chelator die Zell-Zell-Verbindungen. So wur-
den die Zellen von der Monolayer Membran abgelöst und anschließend in frischem

serumhaltigem Medium resuspendiert. In einem 15 ml Falcon wurde die Zellsuspension für 3 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und je nach Bedarf verdünnt.

4.3.1.5 Kryokonservierung und Rekultivierung

Aus passagierten Zellen, die zuvor subkonfluent gewachsen waren, wurde ein Zellpellet gewonnen, welches in 90% FCS und 10% DMSO resuspendiert wurde. 1ml der Suspension ($4 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ Zellen) wurde in ein Kryotube überführt. Über Nacht wurden die Zellen in einem Cryo freezing Container (Nalgene) gelagert, welcher mit 100%igem Isopropyl Alkohol gefüllt war. Bei -80°C Umgebungstemperatur wurden die Zellen so 1°C pro Minute heruntergekühlt. Am darauffolgenden Tag konnten die Kryotubes in ein Aufbewahrungsgefäß mit flüssigem N_2 (-176°C) überführt und bis zum nächsten Auftauen gelagert werden. Zur Rekultivierung von kryokonservierten Zellen wurden diese zunächst bei 37°C im Wasserbad in wenigen Minuten aufgetaut. Anschließend wurde die Suspension aus dem Kryotube in ein Kultivierungsgefäß überführt und mit 0,15-0,2 ml Medium pro cm^2 verdünnt. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, um die zytotoxischen DMSO Rückstände und die nicht angewachsenen Zellen zu entfernen.

4.3.1.6 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Nach dem Reinigen mit 70%igem Ethanol, müssen nach dem Auflegen des Deckgläschens Newtonringe sichtbar sein, welche anzeigen, dass das Deckglas richtig angebracht und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA passagiert und in frischem Medium aufgenommen. Die Pipettenspitze mit 20 μl der Zellsuspension wurde am Rand des Deckglases angesetzt und die Kammer durch die Kapillarkräfte automatisch befüllt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vier Eckquadrate (0,1 μl) der Neubauer-Kammer anschließend ausgezählt. Der Zellzahlmittelwert wurde mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert und man erhielt die Zellzahl, die in einem ml Zellsuspension enthalten ist.

4.3.2 Gesamtproteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteins aus Zelllysaten erfolgte durch die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dieses quantitative kolorimetrische Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von Aminosäuren, welche in saurer Lösung vorliegen. Durch die Komplexbildung des Farbstoffes verschiebt sich

dessen Absorptionsmaximierung von 465 nm nach 595 nm. Als Eichkurve wurde für diesen Assay eine Standardreihe einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (0-10µg) in Doppelbestimmung erstellt

4.3.3 Auftrennung der Proteine und Proteintransfer

Die Proteinauftrennung erfolgte nach der von Ulrich Laemmli beschriebenen Methode der SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), bei der das Detergenz Sodium dodecyl sulfate (SDS, deutsch: Natriumlaurylsulfat) eingesetzt wird (Laemmli, 1970). Die Proteine werden mit dem sog. Laemmli-Puffer versetzt, der als Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol enthält, welches Disulfid Brücken reduziert und die Proteine somit vollständig denaturiert und dissoziiert. Unterschiedliche Ladungen der Proteine werden durch das stark negativ geladene SDS maskiert. In den Tabellen 11 und 12 sind die „Rezepte“ für Trenn- und Sammelgel dargestellt.

Tab. 8: Trenngel (alle Angaben in ml)

	7,5 %	10 %	12 %
H ₂ O	4,9	4,1	3,4
Trenngelpuffer	2,6	2,6	2,6
30% Acrylamid	2,5	3,3	4
10% SDS	0,1	0,1	0,1
10% APS	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01

Tab. 9: Sammelgel (alle Angaben in ml)

H ₂ O	3
Sammelgelpuffer	1,3
30% Acrylamid	0,75
10% SDS	0,05
10% APS	0,03
TEMED	0,01

Zum Erzeugen einer scharfen Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel wurde Isopropanol im nicht-polymerisierten Zustand verwendet.

4.3.4 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF Membran

Die Auftrennung der Proteine und des Proteinstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) erfolgte durch die an der Elektrophoresekammer (Mini-Protean 3 Cell, BioRad, München) angelegte Spannung von 200 V über 90 Minuten.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine für eine immunologische Detektion auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon P) transferiert. Dafür wurde die PVDF Membran mit 100% Methanol aktiviert, mit aqua bidestillata gewaschen und in Transferpuffer equilibriert. Mittels einer „Semi Dry“ Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) wurden die Proteine auf die Membran bei 250mA für 50-60 min geblottet.

4.3.5 Immundetektion

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde die PVDF Membran mit 10%iger Milchpufferlösung in TBST 0,1 für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper im entsprechenden Puffer über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die einstündige Inkubation mit einem Horseradish-Peroxidase- oder einem Fluorchrom-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Detektion der Antikörperbindung wurde mit ECL Substrat entsprechend der Herstellerangaben und dem ChemoCam Imager durchgeführt.

4.3.6 Gesamt-RNA-Isolation aus Zelllysat

Zur Isolierung wurde das Kulturmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen anschließend einmal mit PBS gewaschen. Darauf wurden 2 ml auf Eis gelagertes PBS in die Kulturflasche gegeben, die Zellen mit einem Cellscraper abgeschabt und im zuvor zugegebenen PBS aufgenommen. Die Hälfte wurde für Proteinbestimmung zum Nachweis der stabilen Überexpression mit Lysepuffer versetzt und asserviert. Die andere Hälfte wurde zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und im Anschluss mit 700 µl TRIzol® Reagent (Invitrogen Darmstadt, Deutschland) zur Lyse versetzt. Die Gesamt-RNA-Isolation wurde entsprechend dem Protokoll von Invitrogen durchgeführt, modifiziert nach der von Chomczynski beschriebenen Single-Step Methode. Die isolierte RNA wurde in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

4.3.7 SiRNA-Transfektion

Um ein Gen mittels siRNA auszuschalten, wurden am Tag vor der Transfektion 75000 Zellen im Sixwell-Format ausgesäht, damit die Zelldichte am folgenden Tag zwischen 50 und 70% betrug. Am Tag der Transfektion wurde eine Stunde vor Beginn das Medium gewechselt und serum- und antibiotikumfreies Medium zugefügt. Zu jeweils 200 µl serumfreiem Medium wurde für eine siRNA in zwei unterschiedlichen Ansätzen 3 µl Transfektionsreagenz (siLentFect Lipid Reagent) bzw. 4 µl siRNA gegeben. Die beiden Ansätze wurden nach dem Vermischen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 400 µl in ein Well gegeben.

Tab. 10: Small interfering RNA (siRNA)

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
hCUX1-3	5'- GGAACAGAAGUUACAGAAUtt - 3'	Ambion
hCUX1-4	5'- GAAAGCGGCUUAUCGAACAtt- 3'	Ambion
hCUX1-5	5'- GCAUAAGGUUCAGAGCCUAtt- 3'	Ambion
Kontroll-siRNA	Silencer Negative Control siRNA #1	Ambion

4.3.8 CDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese (Reverse Transcription-PCR) der miRNA können nicht die Primer herkömmlicher Länge (18-30 Basenpaare) verwendet werden, sondern einzig spezifische, den Eigenschaften der miRNA angepasste Primer. Wegen der kurzen Länge der reifen miRNA von ca. 18-25 bp kommen sogenannte Stem-loop Primer zum Einsatz. Stem-loop primer binden am 3' Ende der miRNA und werden durch eine reverse Transkriptase transkribiert, wie in Abbildung 10 gezeigt wird.

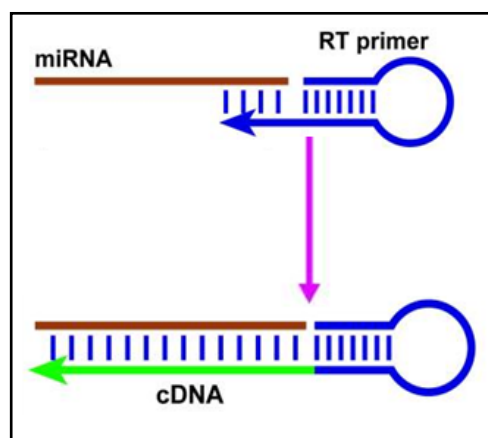


Abb. 10: Stem-loop primer (Chen et al., 2005)

Mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, D) kann die zur miRNA-komplementäre cDNA synthetisiert werden. Die Umschreibung der miRNA erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

4.3.9 MiRNA-Expressionsanalyse

Mit Hilfe der Megaplex Pools von Life Technologies wurde ein Expressionsprofil erstellt. Dank des hohen Datendurchsatzes wurden so 1500 miRNAs der Bon1-Zelllinie gescreent und die Expressionshöhe einzelner miRNAs in Abhängigkeit von der stabilen CUX1-Überexpression ermittelt. Anschließend wurden die Daten mittels der ΔCT -Methode ausgewertet, deren Formeln in Tabelle 14 dargestellt sind.

Tab. 11: Formel für die Expressionsanalyse

ΔCT	=	CT (Zielgen) – CT (Referenzgen)
Relative Expression (E)	=	$2^{-\Delta CT}$
Ratio (Zielgen)	=	$\frac{E (CUX)}{E (Mock)}$

4.3.10 MiRNA Multiplex Präamplifikation

Wegen nicht auslesbarer Ct-Werte führten wir auch bei der Individualvalidierung eine Präamplifikation durch, um die Menge des eingesetzten RT-Produktes zu erhöhen. Dafür verwendeten wir die PreAmp Reagenzien, die im Rahmen von Profiling Analysen (Megaplex™ Pools Quick Reference Card) zum Einsatz kommen.

4.3.11 QRT-PCR für miRNA

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine sensitive Methode zum quantitativen Nukleinsäurenachweis im Rahmen von Genexpressionsanalysen. Die Akkumulation des PCR-Produkts kann in Echtzeit mittels fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden gemessen werden. Es gibt eine Reihe verschiedener Techniken, die für qRT-Methoden angewendet werden. Eine der aussagekräftigsten Methoden ist die qRT-PCR mittels Hydrolyse-sonden (TaqMan™-Sonden). Die TaqMan Sonden sind cDNA-spezifische Oligonukleotide, die mit einem mittleren Bereich der Template cDNA hybridisieren. Diese Sonden sind mit einem Reporterfarbstoff (z.B. Fam) und einem weiteren Farbstoff, dem Quencher, versehen. Der Quencher ist in der Lage, die Fluoreszenzemission des Reporters abzufangen, solange die Sonde intakt ist. Bei der Elongation wird die Sonde durch die Polymerase abgebaut. Die Sonde wird hydrolysiert und der freigesetzte Re-

porter kann fluoreszieren. Je mehr Amplifikate entstehen, umso stärker wird das Signal des fluoreszierenden Reporterfarbstoffs (Huggett *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006). Eine weitere Methode ist der Nachweis der dsDNA durch den nicht-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der jede doppelsträngige DNA bindet und somit quantitativ erfassbar markiert. Die Quantifizierung wird über den sogenannten Ct-Wert (engl. cycle threshold, Schwellwert-Zyklus) vorgenommen. Die Expression des Zielgens wird zur Expression eines Referenzgens (housekeeping gene) normalisiert. Die für die qRT-PCR verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 12: MiRNA-spezifische cDNA-Primer

Gen	Zielsequenz	Referenz
hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	(Landgraf <i>et al.</i> , 2007)
hsa-miR-302c-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	(Landgraf <i>et al.</i> , 2007)
hsa-miR-1296-5p	UUAGGGCCCUGGCUCCAUCUCC	(Meunier <i>et al.</i> , 2013)
hsa-miR-564 sl*	AGGCACGGUGUCAGCAGGC	(Cummins <i>et al.</i> , 2006)
U6 snRNA	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATA- TACTAAAATTGGAACGATACAGAGAA- GATTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGAT- GACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATA- TTTT	(Zhao <i>et al.</i> , 2013)
RNU48	GATGACCCAGGTAAGTCT- GAGTGTGTCGCTGATGCCATCAC- CGCAGCGCTCTGACC	(Lauc <i>et al.</i> , 2013)

*sl=stem loop

4.3.12 Primer für cDNA-Synthese

Tab. 13: CDNA-Synthese-Primer

Bezeichnung	Sequenz
Oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'

4.3.13 QRT-PCR für mRNA (SyBr Green)

Tab. 14: QRT-PCR Primer

Gen	Zielsequenz
hTYMS_Taq_for	5' - AGGGTATCTGACAATGCTGAGGTT - 3'
hTYMS_Taq_rev	5' - TAAGTACGTGGGATTGAAATGCA - 3'
hDPYD_Taq_for	5' - CATGCGTGAGATGGGTGTACA - 3'
hDPYD_Taq_rev	5' - ACTATTAAAACCAGTCAGAGCCCGTAT - 3'
hMGMT_Taq_for	5' - AGCGTGTCTGCCCTTTCTGTT - 3'
hMGMT_Taq_rev	5' - AGCAAGGGCAGCGTTAGAGA - 3'

4.4 *In vivo* Experimente

4.4.1 Xenograft Mausmodell

Weibliche thymusaplastische Nacktmäuse (nu/nu) wurden vom Biotechnologielabor Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Versuchsmäuse wurden in einem spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich der Tierexperimentellen Einrichtung der Universität Marburg gemäß den geltenden Versuchstierrichtlinien gehalten. Dabei hatten die Mäuse stets freien Zugang zu Futter und Wasser. Es wurden zwei Kohorten mit jeweils 6 Tieren gebildet. Den Nacktmäusen wurden subkutan in beide Flanken 1×10^6 Bon1-Zellen, aufgenommen in 0,1ml isotonischer Kochsalzlösung, injiziert. Jeweils eine Kohorte wurde mit CUX1-überexprimierenden oder Leervektor-transfizierten Bon1-Zellen beimpft. In jeder Gruppe wurde für eine Hälfte der Mäuse Klon 1 und für die andere Hälfte Klon 2 verwendet. Einem Tier wurde in beide Flanken immer der gleiche Klon injiziert. Über einen Zeitraum von 7 Wochen wurden die Tiere nach vorgegebenen Kriterien beobachtet. Dabei wurde der Gesamtzustand der Mäuse im Hinblick auf Volumen, Größe und Gewicht 2-mal pro Woche dokumentiert. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere getötet und die gewachsenen Tumoren als Probenmaterial gewonnen.

4.4.2 Vorbereitung der Gewebe

Die Gewebe wurden nach Standardverfahren vorbereitet. Um der Auto- bzw. Heterolyse vorzubeugen wurde das Gewebe mit 4 % neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in heißem Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit dem Mikrotom Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt.

4.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung stellt eine Routinefärbung zur morphologischen Übersichtsbeurteilung des Gewebes dar. Dazu wurden die Schnitte zu Beginn 2x10 Minuten in Xylol inkubiert und somit entparaffiniert. Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden Ethanolreihe (100, 90, 80, 70, 50 und 0 %) für jeweils 3 Minuten inkubiert und somit rehydriert. Darauf folgte der eigentliche Färbeschritt bei einer 7-minütigen Inkubation in Hämatoxylin-Lösung nach Mayer, welche alle nukleinsäurereichen Zellbestandteile (Zellkerne mit DNA, raues endoplasmatisches Retikulum mit rRNA der Ribosomen) in einer blauvioletten Farbe darstellt. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült, was den blauen Färbeneffekt verstärkt („Bläuen“). Die zytoplasmatische Gegenfärbung erfolgte standardmäßig in einer 0,5

%igen Eosin G-Lösung. Im Anschluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 80, 90, 100 %) dehydriert, wiederum 2x10 Minuten in Xylol inkubiert und mit dem DePeX Eindeckmedium eingedeckelt, um die Präparate vor dem Austrocknen zu schützen.

4.4.4 Immunhistochemie

Immunhistochemie ist eine feingewebliche Untersuchungsmethode, bei der man Proteine durch eine antikörpervermittelte Farbreaktion sichtbar und damit quantifizierbar machen kann. Ändert sich die Expressionstärke eines Gens, so kann dies über eine Quantifizierung des Genprodukts indirekt sichtbar gemacht werden. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode verwendet (Abb. 11).

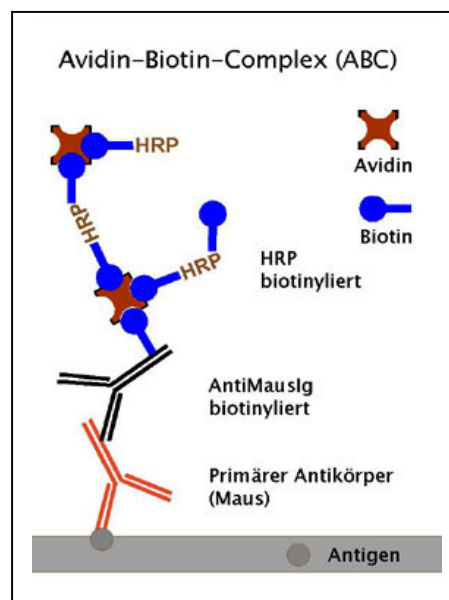


Abb. 11: Schematische Darstellung der Signalverstärkung bei der IHC (Hofbauer)

Bei dieser Methode bindet zunächst der applizierte Primärantikörper die gesuchte Antigen determinante im Gewebeschnitt. Anschließend bindet der biotinylierte Sekundärantikörper am Fc-Teil des Primärantikörpers. Anschließend dient Avidin als Brücke zwischen dem biotinylierten Sekundärantikörper und der biotinylierten Horseradishperoxidase (HRP). Das wasserlösliche Chromogen Diaminobenzidin (DAB), ein Peroxidasubstrat, wird von der HRP oxidiert und bildet ein braunes Präzipitat, das lichtmikroskopisch detektiert werden kann.

4.4.4.1 Durchführung der Färbung

DPD- und TS-Färbung wurden von der Abteilung für Pathologie durchgeführt.

Die Färbungen wurden an Schnitten mit 3 µm Dicke auf Superfrost-Plus Objektträgern durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst in Xylol (2-mal 15 Minuten) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (100-50 % Ethanol). Die Antigendemaskierung fand unter Hitze im Zitratpuffer (ph=6) im Dampfgarer für 30 Minuten statt. Bei Raumtemperatur wurde 15 Minuten lang mit 10 %iger Wasserstoffperoxidlösung die endogene Peroxidase geblockt. Anschließend wurden mit Normalse- rum die unspezifischen Bindungen geblockt und die Schnitte mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert (Tabelle 15). Am kom- menden Tag wurde mit dem Biotin-markierten Sekundärantikörper inkubiert und im Anschluss die Avidin-horseraddish Peroxidase zugegeben, welche das Chromogen DAB als Substrat hat. Die Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt, in aufstei- gender Alkoholreihe dehydriert und anschließend mit einem Deckglas bedeckt. Bei allen Färbungen wurden stets ein Positivkontrollschnitt und ein Negativkontrollschnitt mitgefärbt.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tab. 15: Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
Ki67 (Klon SP6)	Rabbit	1:600	Monoklonal	Thermo Scientific
MGMT (Klon MT 3.1)	Mouse	1:25	Monoklonal	Thermo Scientitic
DPYD (EPR8811)	Rabbit	1:250-1:500	Monoklonal	Abcam
TS (Klon TS 106)	Mouse	1:50-1:500	Monoklonal	Dako
CD31	Mouse	1:20	Monoklonal	Dianova

4.4.4.2 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen

Ki-67

Zur Auswertung der Ki-67 Färbungen wurde das Präparat durchgemustert und prozen- tual der Anteil positiver Zellen pro Sichtfeld bestimmt. Es wurden jeweils 10 Sichtfelder ausgezählt.

MGMT, DPD, TS, CD31

Die immunhistochemischen Färbungen wurden, in Anlehnung an den beim Mammakarzinom verwendeten Bewertungsmodus ausgewertet. Dieser als Remmele-Stegner bekannte Score berücksichtigt die Gesichtspunkte Färbeintensität (FI) und Prozentsatz positiver Zellen (PPZ) (Remmele und Stegner, 1987). Der endgültige Score (IRS, immunoreaktiver Score) wird durch Multiplikation der beiden unabhängigen Werte berechnet. Die Präparate wurden von zwei (MGMT) bzw. drei (DPD, TS) unabhängigen Untersuchern mikroskopiert und bewertet. In Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper wurde der Cut-off-Wert für schwache, mäßige bzw. starke Expression dem maximal 12 Punkte umfassenden IRS angepasst. Der IRS errechnet sich als Produkt aus Färbeintensität (FI) und dem Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (PPZ):

$$\text{IRS} = \text{Score (FI)} \times \text{Score (PPZ)}$$

Tab. 16: Färbeintensität (FI)

Färbeintensität (FI)	Score
Keine Färbereaktion	0
Schwache Färbereaktion	1
Mäßig starke Färbereaktion	2
Starke Färbereaktion	3

Tab. 17: Prozent positiver Zellen (PPZ)

Prozent positiver Zellen (PPZ)	Score
0%	0
< 10%	1
10% - 50%	2
51% - 80%	3
>80 %	4

4.5 Patientendaten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv klinische Daten von Patienten mit neuroendokrinen Tumoren erhoben, die in den Jahren 2000 bis 2010 am Uniklinikum Marburg eine Chemotherapie mit DTIC oder 5-FU/STZ erhalten hatten. Die Auswahl der Patienten erfolgte mittels Orbis Suchanfrage. Die Daten zur Charakterisierung der Patienten wurden aus dem Orbis System erhoben und fehlende durch direkte Nachfrage bei den Hausärzten ergänzt. Als Parameter wurde neben dem Alter der Patienten auch ihr Geschlecht erfasst. Außerdem wurde erhoben, ob es sich um die Erst- oder Zweittherapie handelte und ob bereits eine lokoregionäre Therapie erfolgt war. Daneben wurde der Ursprung des Tumors und das Grading dokumentiert. Zudem war von Interesse, wie viele Zyklen der Chemotherapie die Patienten erhalten hatten. War Tumorgewebe vorhanden, so wurde dieses immunhistochemisch hinsichtlich der Expressionsstärke der Zielenzyme untersucht. Ausgewertet wurde die Färbung mit dem Remmele-Stegner-Score. Zielkriterien für die Evaluation der therapeutischen Effektivität waren die im folgenden Punkt beschriebenen Parameter.

4.5.1 Definition klinischer Endpunkte

Klinische Endpunkte, die bei der Auswertung der Patientendaten zur Anwendung kamen gemäß den RECIST-Kriterien (vgl. Eisenhauer *et al.*, 2009):

- Vollremission - Complete Response (CR): bildgebend und /oder laborchemisch ist der Tumor nicht mehr nachweisbar
- Teilremission - Partial Remission (PR): $\geq 30\%$ Abnahme der Summe aller messbaren Tumormanifestationen, Tumor ist aber noch nachweisbar
- Objektive Ansprechrates – Objective Response Rate (ORR): Summe von CR und PR
- Tumorprogress – Progressive Disease (PD): Größenzunahme des Tumors um mindestens 20 %
- Stabile Erkrankung - Stable Disease (SD): weder PR noch PD
- Disease Control Rate (DCR): CR, PR oder SD
- Das Gesamtüberleben - Overall Survival (OS): Zeitraum vom Tag der ersten Therapie bis zum Tod des Patienten, unabhängig von der Todesursache
- Progressionsfreies Überleben - Progression Free Survival (PFS): Zeitraum vom Tag der ersten Therapie bis zur Krankheitsprogression oder Tod des Patienten, unabhängig von der Todesursache

4.5.2 Dacarbazin-behandelte Patienten

In der Datenbank fanden sich 79 Patienten, denen in vierwöchigem Abstand 650 mg/m^2 DTIC intravenös verabreicht wurde. Voraussetzung für die Applikation dieses Medikaments war eine radiologisch nachgewiesene Tumorprogression nach RECIST-Kriterien (Therasse *et al.*, 2000).

4.5.3 5-Fluorouracil-behandelte Patienten

Die 41 Patienten hatten alle 43 Tage die Medikamente STZ/5-FU in Kombinationstherapie mit 500 mg/m^2 STZ und 400 mg/m^2 5-FU über jeweils fünf Tage als Infusion bekommen.

5 Ergebnisse

5.1 CUX1 in der Maus – Xenograft-Experimente

Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten deutliche regulatorische Effekte von CUX1 im dukalen Pankreaskarzinom (Michl *et al.*, 2005). Deshalb wurde die CUX1-Expression in neuroendokrinen pankreatischen Tumoren untersucht. Die Färbung humaner Insulinome gegen CUX1 zeigte eine starke CUX1-Expression (Krug *et al.*, 2014). Daraufhin folgten *in vitro* Versuche mit NEN-Zelllinien (Bon1 und Ins-1). Hier ließen sich in CUX1-überexprimierenden Zellen einige der im exokrinen Pankreas beschriebenen, die Tumormorprogression fördernden Effekte nachweisen. So bestätigte sich beispielsweise der regulatorische Effekt von CUX1 auf die Proliferation und Angiogenese (Krug *et al.*, 2014). Das führte zur Fragestellung, welche Funktion CUX1 *in vivo* bei PNEN besitzt. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Xenograft-Modell mit Nacktmäusen gewählt. Für die subkutanen Injektionen wurden stabil transfizierte Bon1-Zellen verwendet, deren Überexpression mittels Immunoblot-Analyse bestätigt wurde. Mock bezeichnet die mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen. Diesen Immunoblot zeigt die Abbildung 12.

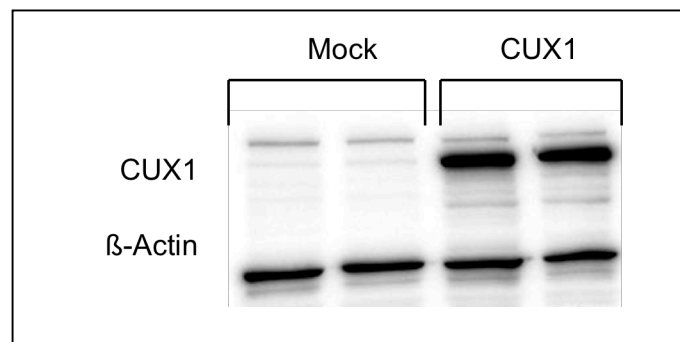


Abb. 12: Immunoblot der zur Injektion verwendeten Zellklone

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 7 Wochen wurden die Tiere geopfert und die Tumoren als Probenmaterial gewonnen. In der repräsentativen Abbildung 13 zeigt sich bereits makroskopisch ein deutlicher Größenunterschied zwischen dem Wildtyp-tumor (Mock, links) und dem CUX1-überexprimierenden Tumor (rechts). Zusätzlich fällt in diesem Beispiel makroskopisch eine deutlich stärkere Vaskularisierung des CUX1-Tumors auf.

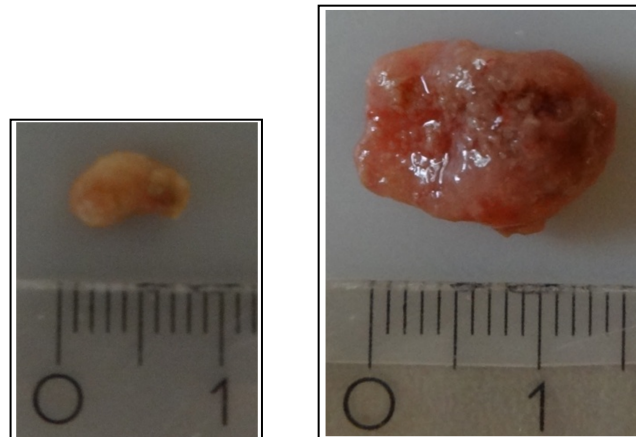


Abb. 13: Exemplarische Xenograft-Tumoren. Links: Wildtyp-tumor, rechts: CUX1-überexprimierender Tumor

Abbildung 14 zeigt einen repräsentativen Westernblot aus Tumorproteinlysaten von CUX1-überexprimierenden und Kontroll (Mock)-Tumoren zum Nachweis der weiterhin bestehenden CUX1-Überexpression nach Beendigung des Xenograft-Versuchs.

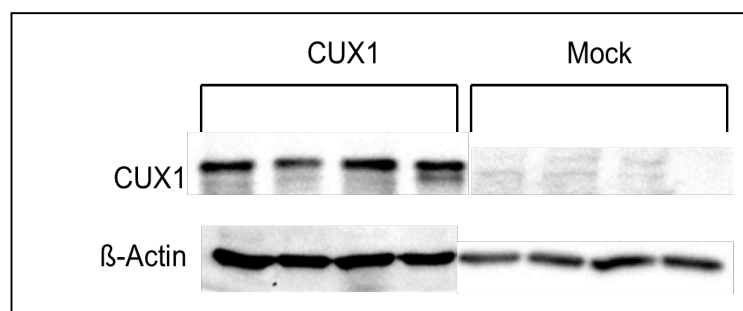


Abb. 14: Immunoblot von Tumorproteinlysat zur Bestätigung der CUX1-Überexpression

Zunächst wurden die Tumoren hinsichtlich ihres Volumens untersucht. Abbildung 15 A zeigt die Gegenüberstellung der Tumorumfänge bei Exstirpation. Die Wildtyp-Tumoren (WT) hatten im Mittelwert (MW) ein Volumen von 133,79 mm³. Mit 226,17 mm³ waren die CUX1-überexprimierenden Tumoren im Mittel größer jedoch ohne statistisch signifikant zu sein. Bei der Tumorexstirpation wurden keine Hinweise für eine lymphogene, peritoneale oder hepatische Metastasierung gefunden.

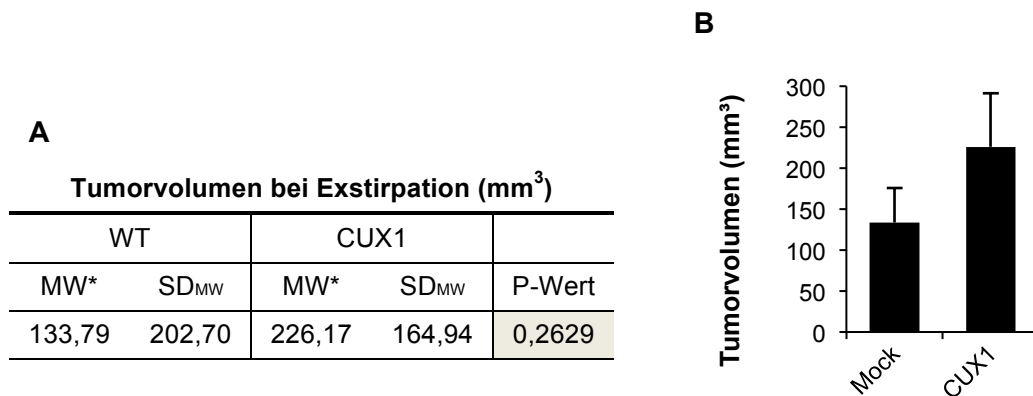


Abb. 15: Tumorumfang bei Exstirpation

A: Tabellarische Darstellung der Tumorumfänge in mm³, B: Darstellung der Ergebnisse als Boxplot

Nachdem *in vitro* Vorarbeiten einen Anstieg der Zellproliferation gezeigt hatten, konnte auch *in vivo* ein signifikanter Anstieg der Proliferation in Abhängigkeit von CUX1 gezeigt werden. Die Proliferationsfraktion der Tumorzellen wurde mit Ki-67 untersucht. Untenstehende Abbildung zeigt die Ki-67 Färbung in einem CUX1-überexprimierenden Xenograft-Tumoren (links) und in einem Wildtyp-tumor (rechts, Abb. 16).

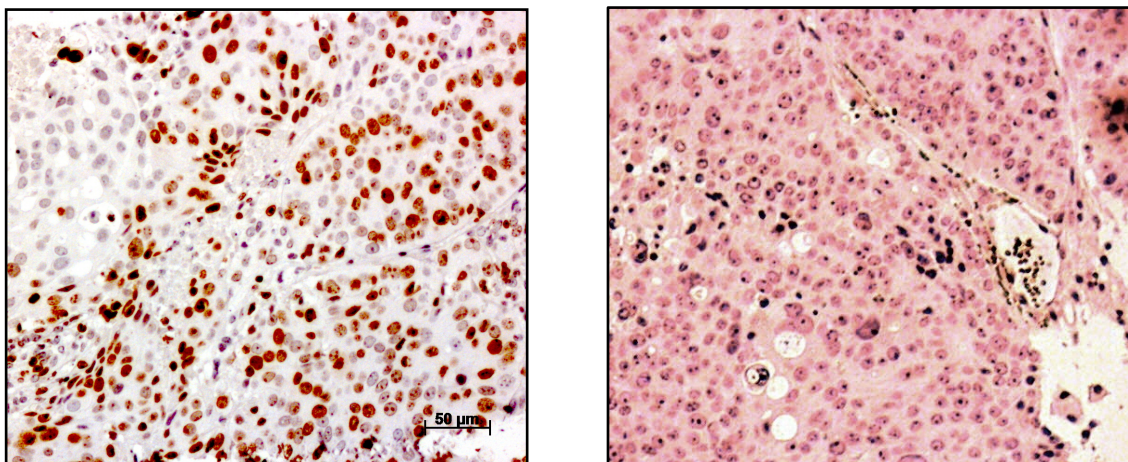


Abb. 16: Zwei exemplarische Ausschnitte zweier immunhistochemischer Färbungen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 in einem CUX1-überexprimierenden Xenograft (links) und einem Wildtyp-tumor.

Der Anteil Ki-67 positiver Zellen ist in nachstehender Abbildung dargestellt (Abb. 17). Die Proliferationsfraktion beträgt in 10 Gesichtsfeldern bei den Wildtyp-Tumoren 14,58% und in CUX1-überexprimierenden Tumoren 37,47 %. Diese Werte ergeben einen signifikanten Unterschied im T-Test zugunsten der CUX1 mit einem p-Wert von 0,014.

A

Ki-67 (%)				
WT		CUX1		P-Wert
MW*	SD _{MW}	MW*	SD _{MW}	
14,58	7,71	37,47	15,30	0,014

*MW: max. 10 Gesichtsfelder

B

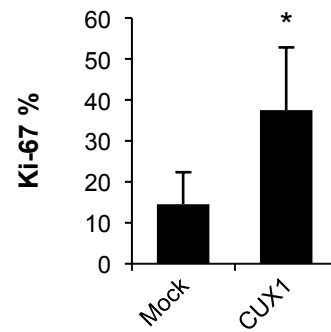


Abb. 17: Proliferationsindex Ki-67

A: Tabellarische Darstellung der Ki-67 positiv gefärbten Zellen in Prozent, B: Darstellung der Ergebnisse als Boxplot, *P < 0,05

Immunhistochemisch wurde in der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung vitales Gewebe von nekrotischem Gewebe unterschieden und deren Fläche ausgemessen, um diese vergleichen zu können (Abb. 18).

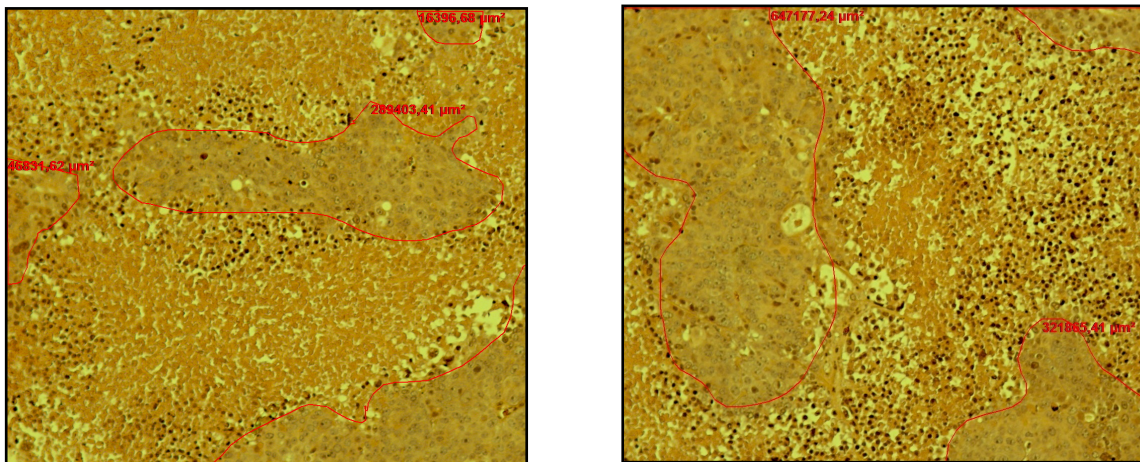


Abb. 18: Zwei exemplarische Übersichtsfärbungen mit rot umrandeten Nekrosearealen, deren Größe so bestimmt werden kann.

In der folgenden Abbildung sind Mittelwerte der ausgemessenen Nekroseareale dargestellt (Abb. 19). Für die Wildtyp-Tumoren zeigte sich ein Mittelwert von 49,66% nekrotischer Areale. CUX1-überexprimierende Tumoren hatten einen signifikant geringeren Anteil an Nekrose (24,81%). Der T-Test ergab einen P-Wert von 0,027.

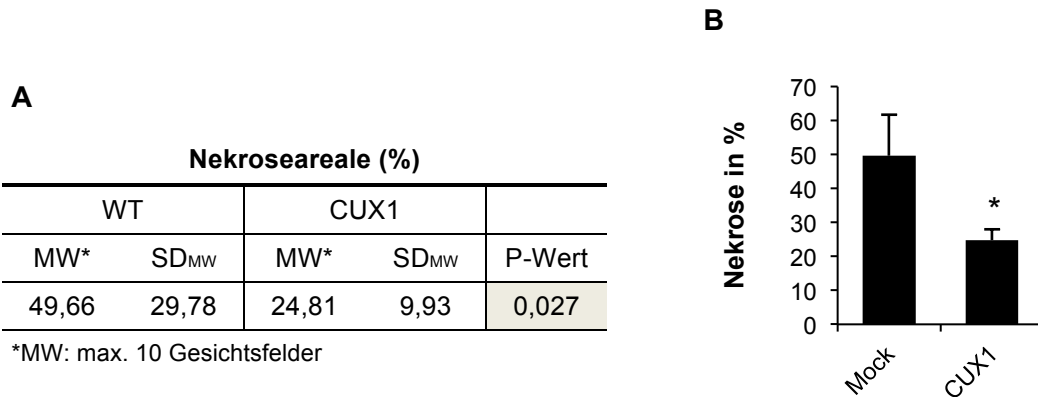


Abb. 19: Nekroseareale

A: Tabellarische Darstellung der prozentualen Nekroseareale, B: Darstellung der Ergebnisse als Boxplot, *P < 0,05

Zur Quantifizierung der intratumoralen Neovaskularisierung und als Hinweis auf einen proangiogenetischen Effekt von CUX1 wurden die Präparate mit CD31 gefärbt (Abb. 20). Aufgrund der geringen Färbespezifität wurden keine signifikanten Effekte detektiert. Mögliche Ursachen dafür werden später in dieser Arbeit diskutiert.

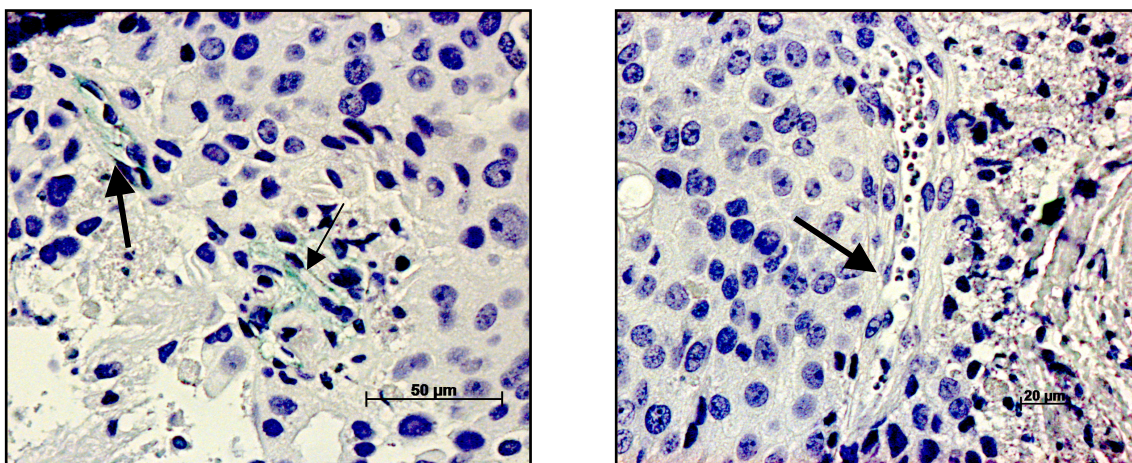


Abb. 20: Exemplarische immunhistochemische Färbungen gegen CD31

Endothelien mit Pfeil markiert. Links: türkisblaue Färbung mit Histogreen, rechts: keine spezifische Endothelfärbung.

5.2 CUX1-Expression in humanen PNEN

Nach den Untersuchungen von CUX1 im murinen Modell folgte die immunhistochemische Analyse der CUX1-Expression in humanen neuroendokrinen Tumorgewebeproben. Ziel dieser Experimente war es, CUX1 als möglichen Biomarker hinsichtlich einer Korrelation von Expressionshöhe und Therapieansprechen zu evaluieren. Bei den untersuchten Geweben handelte es sich um Proben von Patienten, die als systemische Chemotherapie entweder eine Behandlung mit DTIC oder mit 5-FU erhielten. Insgesamt umfassten die 43 Proben von 31 Patienten 8 Primarien (18,6%) und 35 Metastasen (81,4%). Unter den 8 Primären waren 6 pankreatischen Ursprungs und jeweils ein neuroendokriner Tumor des Magens und des Ileums. Unter den Metastasen bildeten die Lebermetastasen von pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien mit 24 Proben die größte Gruppe. Außerdem wurden eine Kolon-, eine Gefäß- und 2 Lymphknotenmetastasen von pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien untersucht. Daneben fanden sich noch jeweils eine Lebermetastase eines CUP und eines Bronchuskarzinoids. Bei 6 Tumorproben fanden sich 2 Tumorblöcke. Ausgewertet wurde die CUX1-Färbung nach dem im Methodenteil beschriebenen Remmele-Stegner-Score. Abbildung 21 zeigt exemplarische immunhistochemische Färbungen gegen CUX 1 in humanen PNEN.

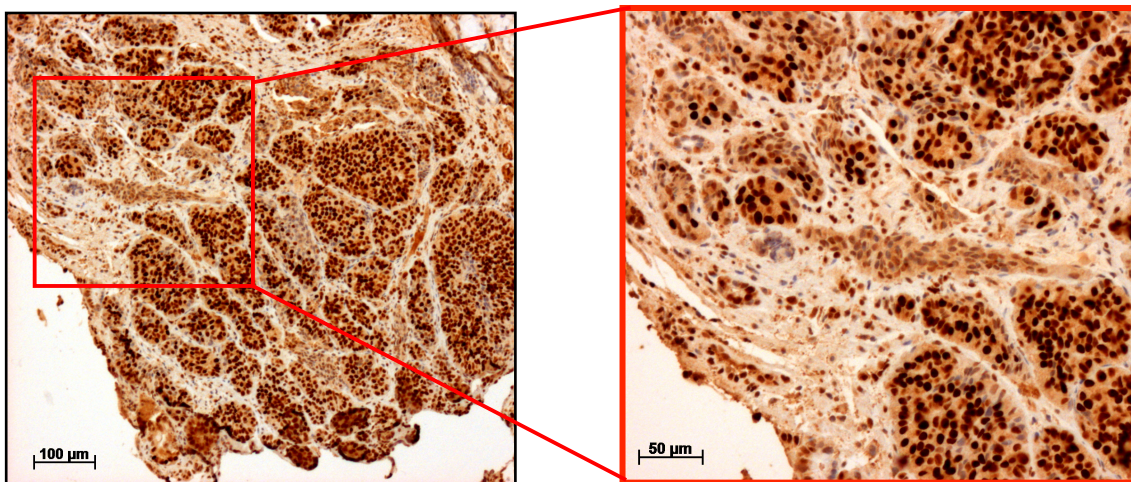


Abb. 21: Exemplarische immunhistochemische Färbungen gegen CUX1 in humanen PNEN:
Die in unterschiedlicher Intensität gefärbten Zellkerne sind deutlich voneinander zu unterscheiden

Aufgeschlüsselt nach Ursprung ergab sich für die Primarien ein durchschnittlicher Scorewert von 6,25 und für die Metastasen ein Wert von 5,86 ($p=0,795$), dargestellt in Abbildung 22. Dies bedeutet, dass die CUX1-Expression in diesem Kollektiv sich nicht eignet, um Primarien von Metastasen zu unterscheiden. Der maximale im Remmele-Stegner-Score zu erreichende Wert beträgt 12.

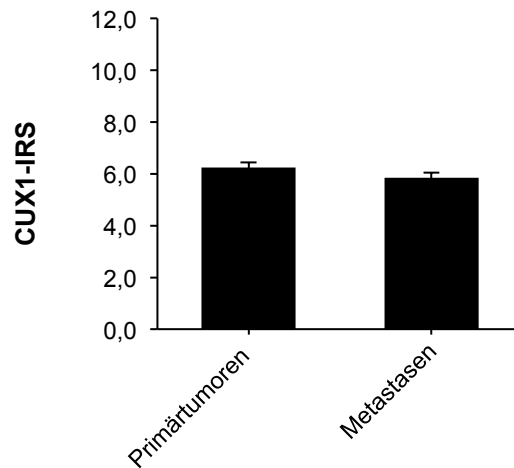


Abb. 22: Durchschnittlicher Scorewert für Primärtumoren und Metastasen; angegeben mit Standardabweichung.

Entsprechend der Vorarbeiten in Insulinom-MTAs zeigte sich auch nun bei den Untersuchungen der pankreatischen neuroendokrinen Tumoren keinerlei Korrelation des CUX1-Scores mit dem Proliferationsindex Ki-67 ($p=0,6$) (vgl. Krug *et al.*, 2014). Die Abbildung 23 stellt exemplarisch einen Ki-67 Anteil von 15% als Grenzwert dar, wobei sich auch in der statistischen Analyse mit 5% bzw. 10% Ki-67-Expression als Grenzwerte keine Korrelation zeigte. Für die CUX1-Expression wurde, wie schon in den Vorarbeiten publiziert, ein Scorewert von 7 als Cut-off verwendet (Krug *et al.*, 2014).

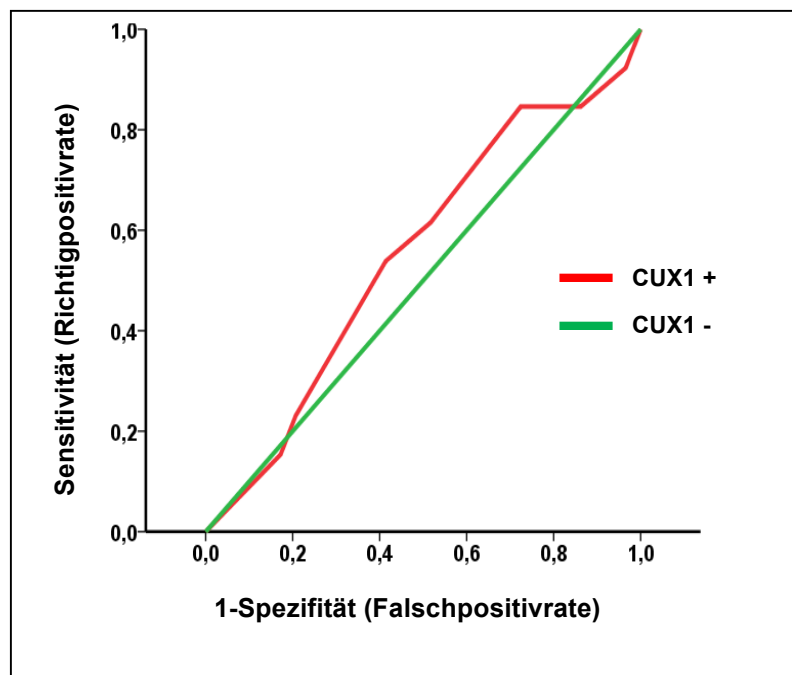


Abb. 23: CUX1-IRS in Korrelation mit dem Proliferationsindex Ki-67

Anschließend stellte sich die Frage, ob das progressionsfreie Überleben (PFS) oder das Gesamtüberleben (OS) der Patienten unter Chemotherapie mit der CUX1-Expression korrelieren. Bei einem CUX1-IRS Cut-off von 8 unterscheidet sich das PFS von Patienten mit CUX1-Expression >8 signifikant von Patienten mit einer Expression <8 ($p=0,008$). Die Abbildung 24 zeigt, dass eine hohe CUX1-Expression (>8) mit einer im Mittel deutlich kürzeren progressionsfreien Zeit (10 Monate) als eine niedrigere CUX1-Expression (<8 ; 19 Monate) vergesellschaftet war. Auch in den Vorarbeiten an Insulinomen war ein CUX1-Cut-off von 8 gewählt worden, bei dem sich ebenfalls eine signifikante Korrelation zeigte (Krug *et al.*, 2014).

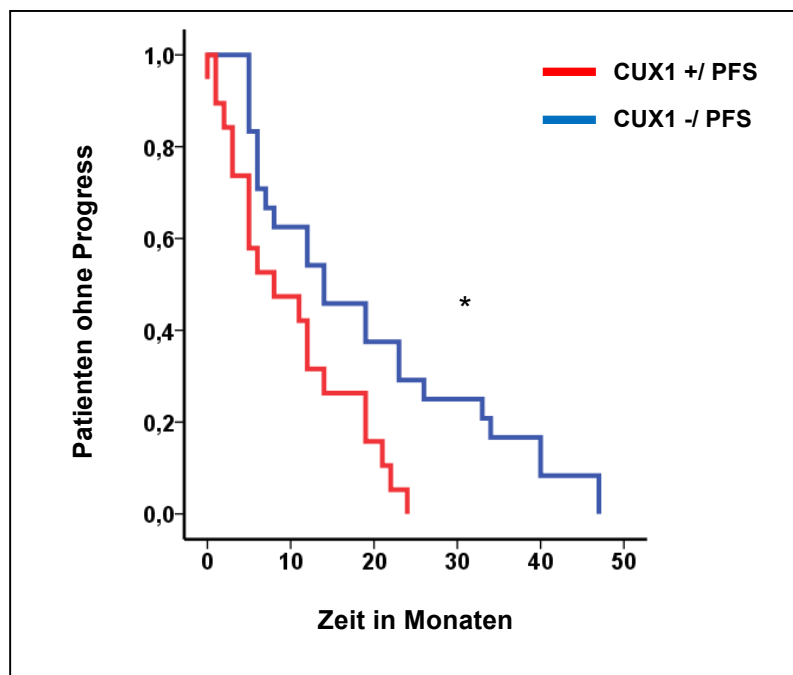


Abb. 24: CUX1-IRS in Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) unter Chemotherapie, $*P<0,05$.

Jedoch ergab sich kein Zusammenhang zwischen CUX1 und dem Gesamtüberleben (OS) der Patienten unter Chemotherapie ($p=0,8$) (Abb. 25).

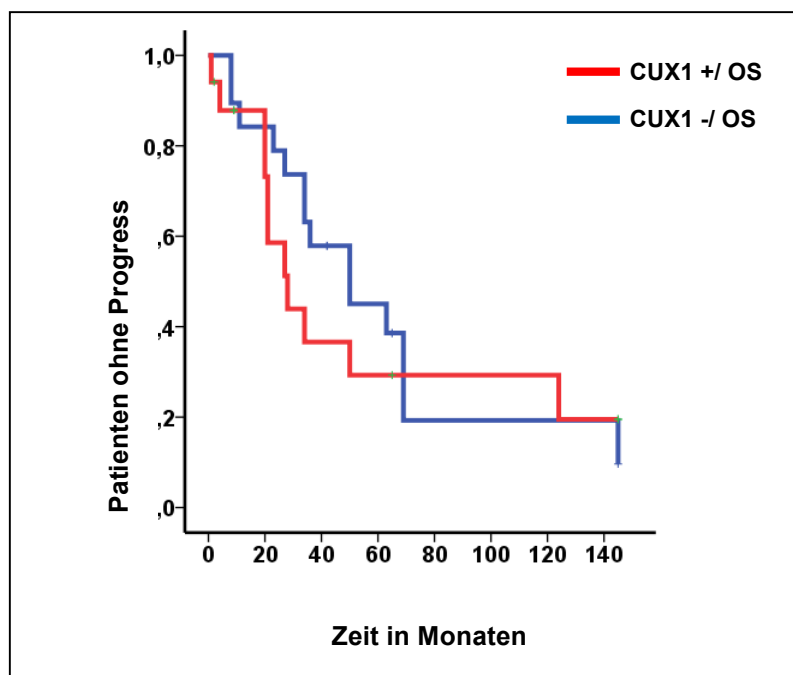


Abb. 25: CUX1-IRS in Korrelation mit dem Gesamtüberleben (OS) unter Chemotherapie

Deshalb wurde weiterhin untersucht, welche Beziehung zwischen CUX1 und der Disease Control besteht. Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass Gewebe von Patienten, deren Tumorwachstum unter Chemotherapie stabil war (DC), durchschnittlich einen signifikant geringeren Remmele-Stegner-Scorewert (5,3) aufwiesen als Gewebe von Patienten, deren Erkrankung progredient verlief (7,5) (no-DC). Dieses Ergebnis war mit einem P-Wert von 0,045 statistisch signifikant. Abbildung 26 zeigt graphisch, dass Patienten der Gruppe no-DC einen signifikant höheren mittleren Scorewert besaßen als Patienten der Gruppe DC. Hingegen zeigte sich keine Assoziation zwischen dem Therapieansprechen (ORR) und CUX1-IRS.

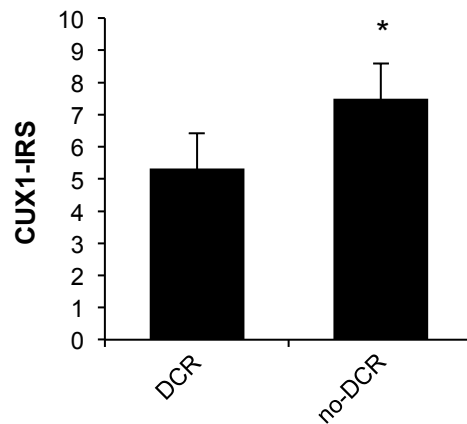


Abb. 26: Durchschnittlicher Scorewert für Gewebeproben von Patienten unter Krankheitskontrolle (DCR) und ohne Krankheitskontrolle (no-DCR); angegeben mit Standardabweichung, * $P < 0,05$.

5.3 CUX1-regulierte miRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze RNA Fragmente, die als posttranskriptionale Regulatoren eine Rolle bei der Pathogenese von Krankheiten spielen. Neueste Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass sie enormes Potential als Biomarker für die Diagnose und Prognose von Erkrankungen haben. Bei der Suche nach Mechanismen, wodurch die tumorfördernden Eigenschaften von CUX1 vermittelt sind, ist die CUX1-abhängige miRNA-Regulation ein möglicher Ansatz. Wegen der hohen Stabilität der miRNAs und der damit verbundenen Möglichkeit zum Einsatz in der Biomarkerdiagnostik waren diese Ziel unserer Analysen.

5.3.1 MiRNA-Expression in Bon1-Zellen nach CUX1-Überexpression

Expressionsprofil

Es wurde ein Real-Time-basiertes Screening durchgeführt, um CUX1-regulierte miRNAs herauszufiltern. Dazu wurde zuvor die CUX1-Überexpression in den Bon1-Zellen mittels Westernblot bestätigt. Abbildung 27 zeigt, dass die Mock (Wildtyp)-Proben kein CUX1 exprimieren, während die CUX1-überexprimierenden Klone eine starke CUX1-Bande zeigen.

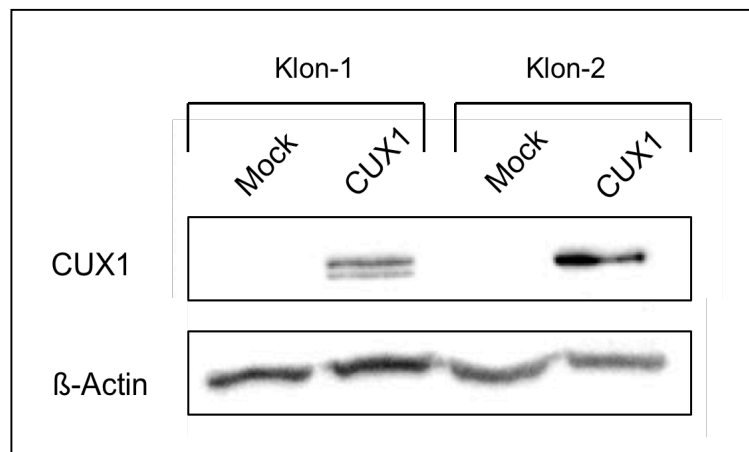


Abb. 27: Immunoblot der beim Profiling verwendeten Zellklone

In Vorarbeiten des Labors wurden 4 differenziell regulierte miRNAs (3 überexprimiert, 1 reprimiert) ausgewählt, um diese anschließend individuell zu validieren und in einem nächsten Schritt mit Inhibitoren oder Mimics zu modulieren. Bei den im Screening ausgewählten miRNAs handelte es sich um die in Tabelle 18 dargestellten.

Tab. 18: Die im Profiling identifizierten, differenziell regulierten miRNAs

Detector	Mittelwert Mock	Mittelwert CUX1	CUX1/Mock-Ratio
hsa-miR-1296	0,000000017	0,000125302	7457,75356120816
hsa-miR-564	0,000000017	0,000030588	1820,51266313082
hsa-miR-885-5p	0,000289067	0,000978822	3,38614508651
hsa-miR-302c	0,001209362	0,000001705	0,00140990953

Individualvalidierung der differenziell regulierten miRNAs

Die ausgewählten differenziell regulierten miRNAs wurden individuell mittels qRT-PCR validiert. Dies stellte methodisch eine besondere Herausforderung dar: Bei allen miRNAs lag die geringe Expressionsstärke an der Grenze zur Nachweisbarkeit. Dies bedingte, dass vor der cDNA-Synthese eine Präamplifikation durchgeführt werden musste, um die miRNA-Expression auswerten zu können.

Die miRNA-Expression wurde in drei unterschiedlichen biologischen Replikaten von zwei kontrolltransfizierten und zwei CUX1-überexprimierenden Bon1-Klonen gemessen. Bei keiner der vier oben genannten miRNAs zeigte sich eine zu den Screening Daten konsistente Regulation durch CUX1. Somit erscheint eine CUX1-abhängige Regulation unwahrscheinlich. Abbildung 28 zeigt graphisch die Expression der vier miRNAs miR-885-5p (1), miR-302c (2), miR-1296 (3) und miR-564 (4) in drei biologischen Replikaten (a, b, c) CUX1-überexprimierender Bon1-Klone.

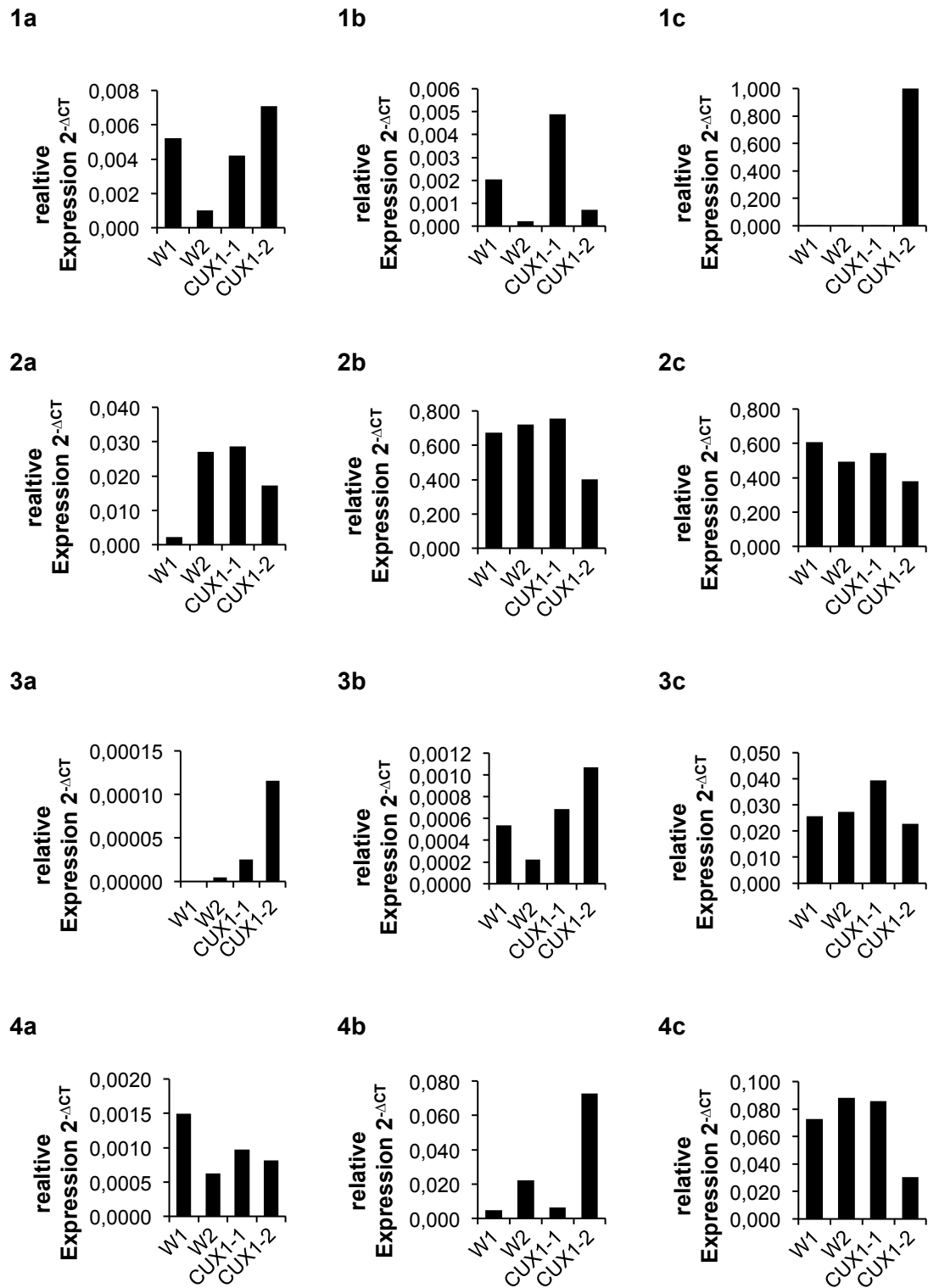


Abb. 28: Expression der miR-885-5p (1), miR-302c (2), miR-1296 (3) und miR-564 (4) in drei biologischen Replikaten (a, b, c)

In Tabelle 19 sind als graphische Synopse die Quotienten von CUX1/WT, gemittelt aus den drei Replikaten, dargestellt. Aufgrund der hohen Standardabweichung der Einzelwerte ist die Regulation nicht statistisch signifikant. Um Überexpressionsartefakte bei der CUX1-abhängigen Regulation auszuschließen, wurden deshalb Experimente unter Knockdown-Bedingungen durchgeführt.

Tab. 19: Mittelwerte der drei biologischen Replikate, dargestellt als Ratio mit Standardabweichung im Vergleich mit den Profildaten

	Ratio CUX1/WT		
	MW*	SDMW	Profil
miR-885-5p	3,18	1,83	3,39
miR-302c	1,11	0,42	0,0014
miR-1296	11,46	16,75	7457,75
miR-564	1,2	0,73	1820,51

*Mittelwert Replikate 1-3

5.3.2 MiRNA-Expression in Bon1-Zellen nach CUX1-Knockdown

Um die selektive Regulation der miRNAs durch CUX1 zu untersuchen, wurde neben Überexpressionsanalysen auch die Expressionshöhe der ausgewählten miRNAs unter Knockdown-Bedingungen gemessen. Erwartet wurde unter diesen Bedingungen eine inverse Regulation der miRNAs im Vergleich zu den im Profiling erzielten Daten. Diese waren unter Überexpressionsbedingungen erhoben worden.

5.3.2.1 CUX1-Knockdown in Bon1-Zellen

Die Bon1-Zellen wurden mit 3 unabhängigen CUX1-spezifischen Oligonukleotiden (si3, si4, si5) transfiziert. Eine Real-Time-PCR wurde nach der Transfektionsdauer von 48 und 72 Stunden durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit nicht funktionell wirksamer siK, zeigt sich an beiden Zeitpunkten eine deutliche Supprimierung der mRNA-Expression (Abb. 29).



Abb. 29: CUX1-Knockdown nach 48 h und 72 h

Real-Time-PCR mit CUX1-spezifischen Primern nach Knockdown mit 3 unabhängigen Oligonukleotiden (si3, si4, si5), mRNA-Expression relativ zu siK.

Im Immunoblot sieht man 72 Stunden nach der Transfektion einen deutlichen Rückgang des CUX1 Proteins. Nach Transfektion mit allen drei siRNAs ist der Knockdown deutlich zu sehen, bei gleichbleibender Proteinmenge der Kontroll-siRNA (Abb. 30).

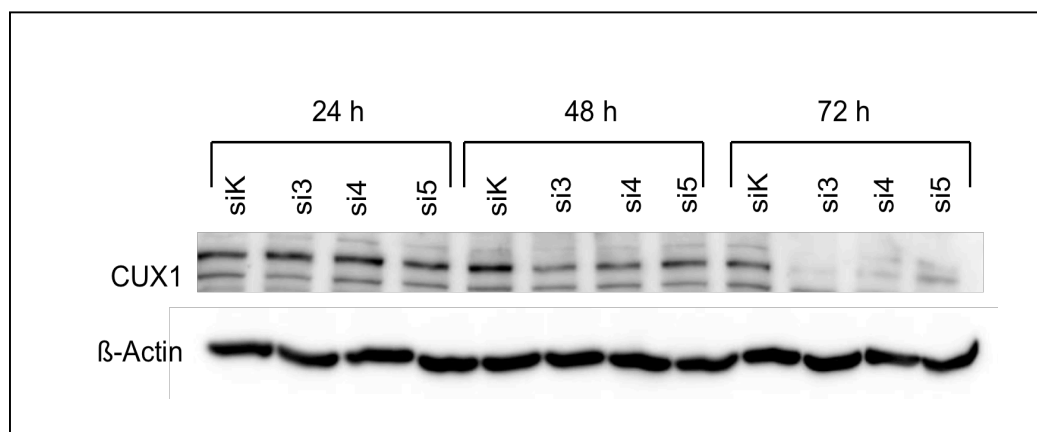
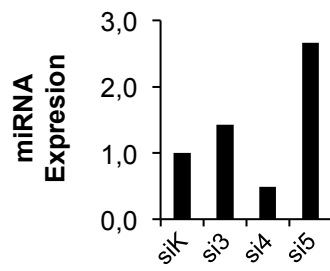


Abb. 30 Immunoblot der Proteinlysate von CUX1-Knockdown Zellen

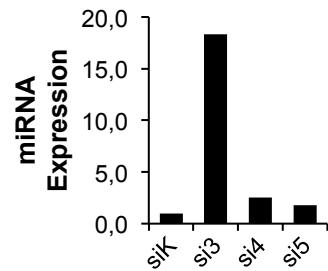
5.3.2.2 MiRNA-Expression nach Knockdown

Anschließend wurde die Expression der im Profil differentiell regulierten miRNAs nach Knockdown von CUX1 in der Real-Time-PCR untersucht. Für keine der vier miRNAs zeigten sich eindeutig veränderte und mit mehreren Oligonukleotid-Sequenzen reproduzierbare Expressionen unter CUX1-Knockdown-Bedingungen nach 48 oder 72 Stunden. So konnte auch keine inverse Korrelation zu den Profildaten nachgewiesen werden. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse in der Detailansicht aufgeschlüsselt nach Transfektionsdauer.

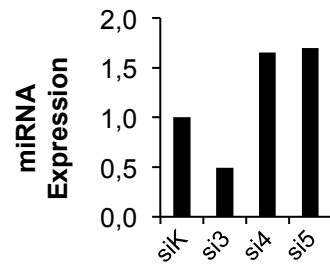
1a



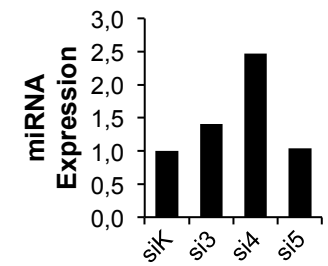
1b



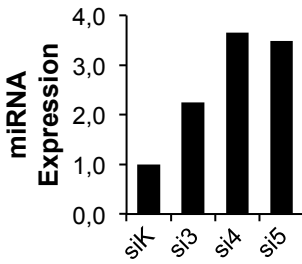
2a



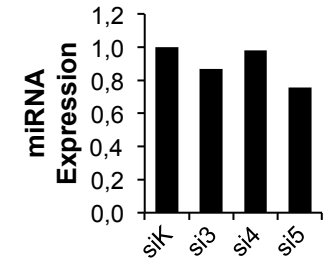
2b



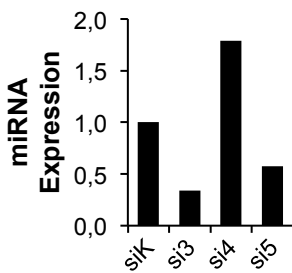
3a



3b



4a



4b

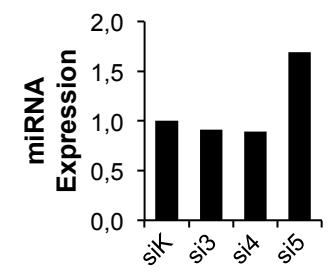


Abb. 31: MiRNA-Expression von miR-885-5p (1), miR-302c (2), miR-1296 (3) und miR-564 (4) in CUX1-Knockdown Bon1-Zellen 48 (a) und 72 (b) Stunden nach der Transfektion, miRNA-Expression relativ zu siK

In Tabelle 20 ist die Expression der vier miRNAs dargestellt. Es wurden die Mittelwerte der miRNA-Expression nach Knockdown mit den siRNAs si3, si4 und si5 gebildet. Zusammengefasst konnte keine der im Profiler gezeigten CUX1-abhängigen Veränderungen bei der individuellen Validierung im Überexpressions- und Knockdown-System bestätigt werden.

Tab. 20: Expression der miRNAs relativ zu siK

	Expression relativ zu siK			
	MW*	SDMW	MW*	SDMW
	48 h		72 h	
miR-885-5p	1,52	1,09	7,53	9,32
miR-302c	1,28	0,68	1,64	0,74
miR-1296	3,13	0,77	0,87	0,11
miR-564	0,90	0,78	1,16	0,46

*Mittelwert si3, si4, si5

5.4 CUX1 und Drug-Metabolismus-assoziierte Gene in Bon1-Zellen

In den nun folgenden Experimenten hat uns die Frage beschäftigt, ob CUX1 potenzielle Drug-Metabolismus-assoziierte Biomarker einer PNEN-Therapie mit 5-FU bzw. DTIC reguliert. Im Fokus standen hierbei die MGMT, TS und DPD. Bei MGMT handelt es sich um ein Reparaturenzym, welches in der Lage ist, alkylierte DNA-Basen wieder zu dealkylieren. Die TS stellt den für die DNA-Reparatur und Synthese notwendigen Pool an essentiellen Thymidylat-Derivaten. DPD reguliert den Abbau natürlich vorkommender Pyrimidine ebenso wie den Abbau von 5-FU. Somit beeinflusst DPD entscheidend die Verfügbarkeit und damit die Pharmakokinetik dieses Chemotherapeutikums. Im folgenden Abschnitt wird die Expression der drei Zielenzyme in der neuroendokrinen Tumorzelllinie Bon1 dargestellt.

Unter Überexpressions-Bedingungen

Die mRNA-Expression der Zielenzyme TS, DPD und MGMT in CUX1-überexprimierenden Bon1-Zellen wurde in 3 unabhängigen biologischen Replikaten von zwei unterschiedlichen Klonen mittels qRT-PCR erhoben. Die DPD und MGMT zeigen eine übereinstimmende Expression in beiden Klonen (Abb. 32). Dies ist jedoch, wie die Standardabweichung zeigt, möglicherweise zufallsbedingt (Tab. 21). Die graphische Darstellung der Klone erfolgt separat in Relativwerten (WT = 1), da eine zusammengefasste Präsentation unter Angabe der Absolutwerte nur eingeschränkt sinnvoll erscheint, weil diese sich zum Teil um Zehnerpotenzen unterscheiden.

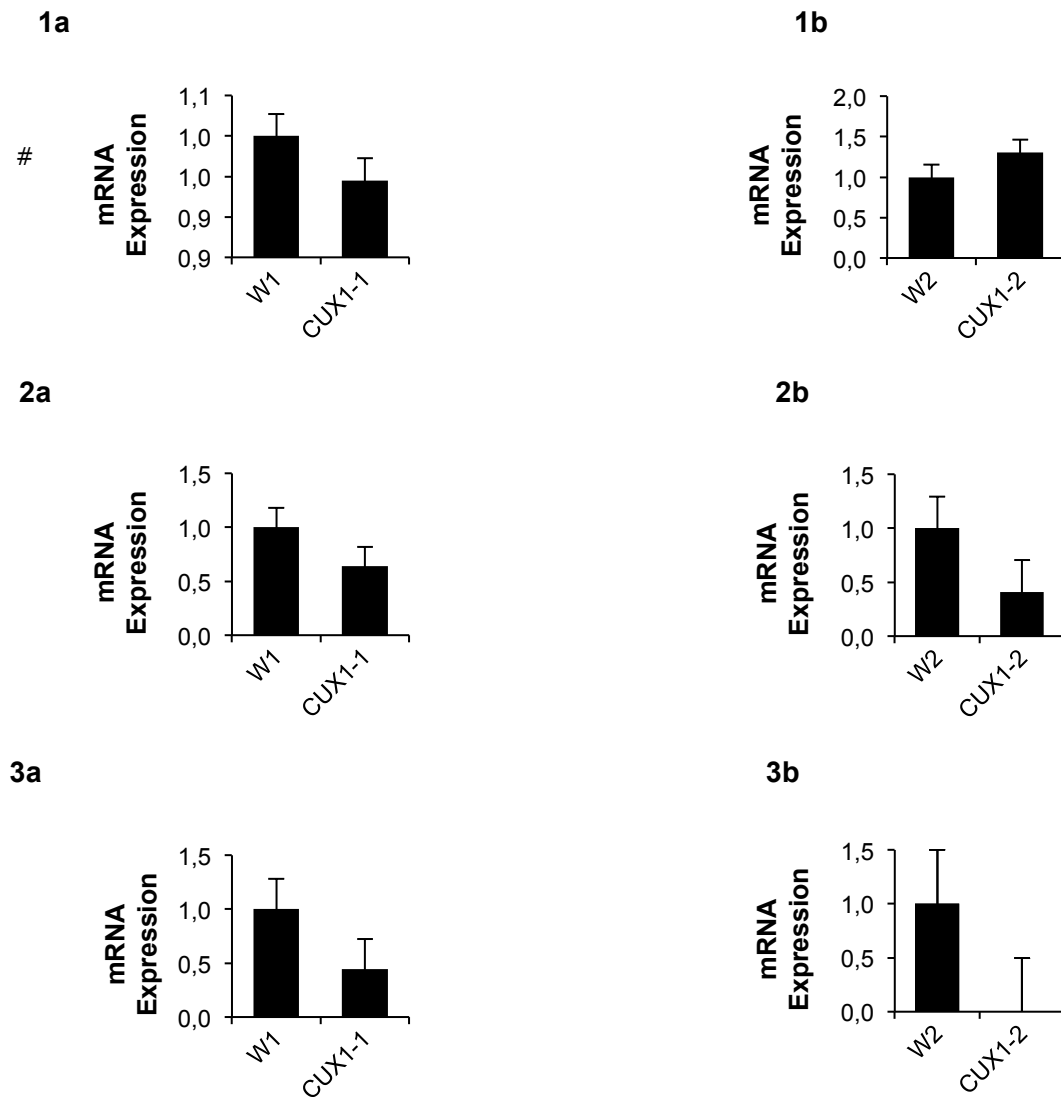


Abb. 32: mRNA-Expression von TS (1), DPD (2) und MGMT (3) in Wildtyp und in CUX1-überexprimierenden Bon1-Zellen. a: Klon 1. b: Klon 2. Angegeben sind die Mittelwerte von 3 biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

Tab. 21: Relative Expression: Ratio von CUX1/WT

relative Expression CUX1/WT					
TS		DPD		MGMT	
MW*	SDMW	MW*	SDMW	MW*	SDMW
1,1003	0,2561859	1,5372218	1,2671325	0,5101637	0,0962326

*MW Replikate 1-3 der Klone 1 und 2

Unter Knockdown-Bedingungen

Neben der Analyse der mRNA-Expression von TS, DPD und MGMT nach Überexpression von CUX1 wurde eine mögliche CUX1-abhängige Expression auch nach CUX1-Knockdown in Bon1-Zellen untersucht. Das unter CUX1-Überexpression im Trend herabregulierte Enzym DPD zeigt jedoch in Knockdown-Zellen keine gegenläufige Korrelation (Abb. 33). MGMT, das Enzym, das unter Überexpressionsbedingungen ebenfalls CUX1-abhängig supprimiert wurde, ist unter Knockdown-Bedingungen hochreguliert, was eine konkordante Regulation darstellt.

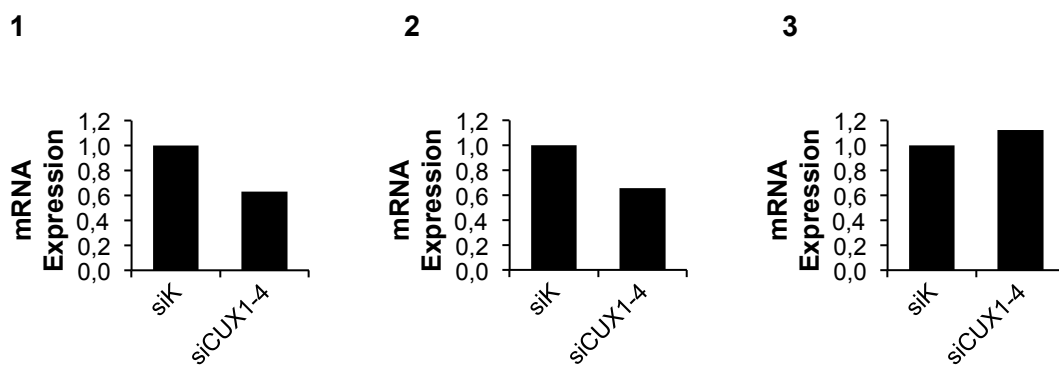


Abb. 33: mRNA-Expression von TS (1), DPD (2) und MGMT (3) in Bon1-Zellen 48 Stunden nach CUX1-Knockdown mit siCUX1-4 Oligonukleotid; angegeben relativ zu siK.

5.5 Expression von Drug-Metabolismus-assoziierten Enzymen und Korrelation zum Therapieansprechen

5.5.1 MGMT-Expression bei DTIC-behandelten Patienten

Zusätzlich zu den Arbeiten zu CUX1 als potenziellem, die Tumorprogression fördernden Biomarker, sollten im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit bereits etablierte Biomarker an einem Kollektiv von NEN-Geweben untersucht werden, die zuvor mit DTIC behandelt wurden. In dieser Untersuchung sollten die klinischen Charakteristika der Patientenkohorte erhoben werden. Außerdem sollte erfasst werden, ob der MGMT-Status der Tumorgewebe prädiktiven oder prognostischen Wert für das Therapieansprechen besitzt. In der Datenbank konnten 79 Patienten identifiziert werden. Unter diesen waren 41 (52%) Männer und 38 (48%) Frauen. Das Alter der Patienten lag mit einem Median von 57 Jahren zwischen 28 und 80 Jahren. Alle Patienten hatten gut differenzierte (G1/G2), metastasierte NEN. Von ihnen waren 52 (65,8%) pankreatischen Ursprungs. 12 (15,2%) Patienten hatten Midgut-NEN, 6 (7,6%) Bronchus, jeweils 2 (2,5%) Hindgut und Magen, 4 (5,2%) CUP (Carcinoma of unknown primary) und ein Patient 1 (1,3%) Thymus-NEN. In dreimonatigen Abständen wurde das biochemische Ansprechen durch Messen von Chromogranin A (CgA) und das radiomorphologische Ansprechen durch CT/MRT Bildgebung und anhand der RECIST-Kriterien beurteilt. 75 (94,5%) der 79 Patienten erhielten DTIC als Zweitlinientherapie. Zuvor hatte ein Großteil der Patienten eine lokoregionäre Therapie, wie z.B. eine Transarterielle Chemoembolisation oder eine Somatostatin-Rezeptorthherapie, erhalten. Eine zeitgleiche Verabreichung letztgenannter Medikamente war auch für den Einschluss in unsere retrospektive Analyse zugelassen. Von den erwähnten 79 Patienten waren von 21 (26,6%) Tumorblöcke für immunhistochemische Untersuchungen verfügbar. Unter den 21 Tumorgeweben waren 16 (76,2%) pankreatischen Ursprungs, wovon 5 NEN-Primarien und 11 hepatische Metastasen waren. Unter den 5 (23,8%) nicht-pankreatischen Ursprungs waren 2 Lebermetastasen von Bronchus-NEN, 2 Midgut- und 1 Magen-NEN sowie 1 NEN unbekannten Ursprungs. Abbildung 34 zeigt als Flowchart die Verteilung der Gewebeproben mit Bezug auf das Ursprungsorgan.

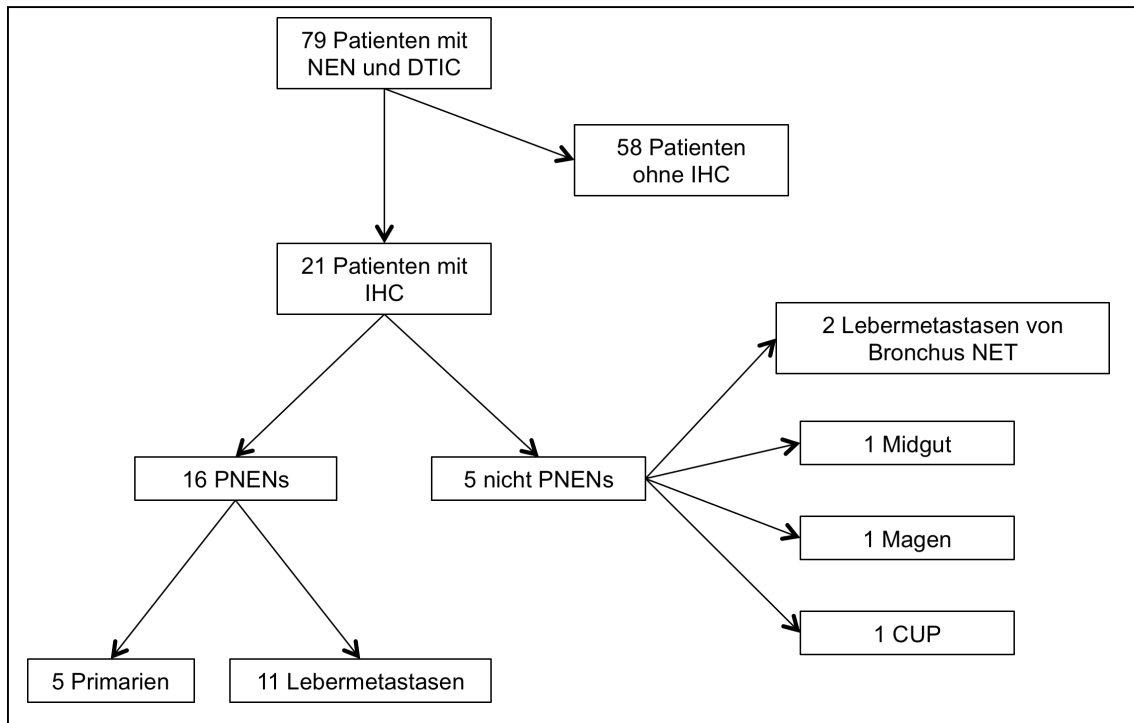


Abb. 34: Flussdiagramm zur Darstellung der retrospektiven Patientenrekrutierung

(P)NEN: (pankreatische) neuroendokrine Neoplasie, DTIC: Dacarbazin, ICH: Immunhistochemie

Die Patienten erhielten eine unterschiedlich große Anzahl von Zyklen (1-46), wobei die durchschnittliche Anzahl bei 8 Zyklen lag. Bei 20 (25,3%) Patienten wurde eine Teilremission (PR) festgestellt. Bei 30 (37,9%) Patienten fand sich eine stabile Erkrankung (SD). Bei 26 (32,9%) Patienten lag eine Größenzunahme mehr als 20% vor (PD). 3 (3,8%) Patienten fielen aus der Analyse heraus, da sie während des Behandlungszeitraums verstorben waren. Die objektive Ansprechrates bei dieser Therapie lag bei 25% und der Anteil der Patienten, deren Erkrankung unter Kontrolle war, bei 63,3%.

Das vorhandene Gewebematerial der 21 Patienten wurde immunhistochemisch gegen MGMT gefärbt. Die Abbildung 35 zeigt repräsentative Schnitte einer PNEN, die durch die MGMT-Färbung unterschiedlich stark gefärbt wurden.

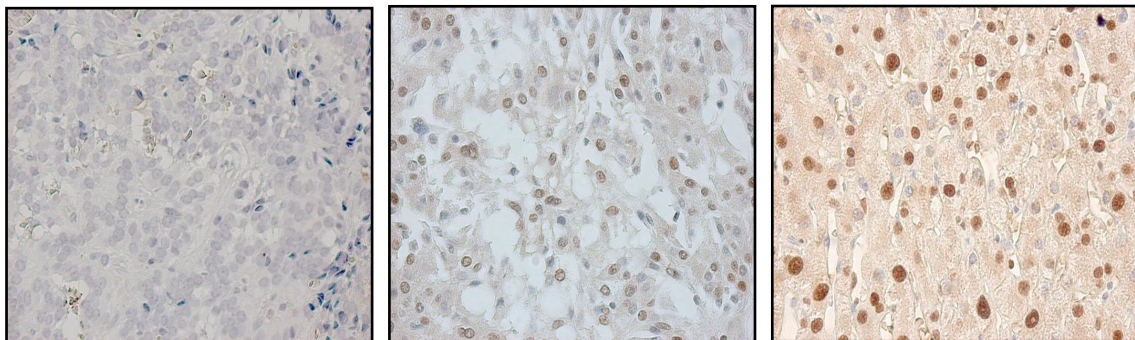


Abb. 35: Repräsentative Schnitte der MGMT-gefärbten Schnitte. Links: negativ, Mitte: mäßig positiv, rechts: stark positiv.

Die Abwesenheit von MGMT wurde in 7 der 16 pankreatischen NEN (43,8%) und 4 der nicht-pankreatischen NEN (80%) dokumentiert. Dagegen gab es eine MGMT-Expression in 9 von 16 PNEN (66,2%), mit 8 (50%) mäßig positiven Tumoren und 1 (6,2%) stark positivem Tumor. 1 (20%) nicht-pankreatische NEN war mäßig positiv. Von den 16 Patienten mit PNEN wurden Primärtumorgewebe von 5 Patienten und Lebermetastasen von 11 Patienten untersucht. 3 (60%) der 5 Primärtumoren waren MGMT-defizient und 2 (40%) zeigten eine mäßig positive Färbung. 4 (36,3%) der 11 Lebermetastasen zeigten keine MGMT-Färbung, 6 (54,5%) waren mäßig positiv und 1 (9,2%) stark positiv (vgl. Tab. 22).

Tab. 22: MGMT-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation

Tumor Typ	MGMT-Färbung			
	n (%)	negativ, n (%)	mäßig positiv, n (%)	stark positiv, n (%)
PNEN	16 (100)	7 (43,8)	8 (50)	1 (6,2)
Primarius	5 (31,3)	3 (60)	2 (40)	0
Lebermetastase	11 (68,7)	4 (36,4)	6 (63,6)	1
Nicht-PNEN	5	4 (80)	1 (20)	0
Bronchus	2	2	0	0
Magen	1	1	0	0
CUP	1	0	1	0
Midgut	1	1	0	0
Alle NEN	21	11	9	1

Unter den 21 Patienten, die mit DTIC behandelt wurden und bei denen immunhistochemische Färbungen vorhanden waren, hatten 16 (76,2%) eine Objective Response. 12 (75%) dieser 16 Patienten waren der PNEN-Gruppe und 4 (80%) davon der Nicht-PNEN-Gruppe zugehörig. In der PNEN-Kohorte zeigten 6 Patienten mit OR einen MGMT-defizienten Tumor, wohingegen die verbliebenen 6 (50%) Tumoren eine mäßige oder stark positive MGMT-Färbung zeigten. 3 (75%) der 4 Patienten mit PD in den PNEN-Gruppe waren mäßig positiv für MGMT. Von den 4 Patienten mit OR waren 3 Tumoren MGMT-negativ und 1 Tumor war mäßig positiv. Der Patient mit PD in dieser Kohorte zeigte einen MGMT-defizitären Tumor. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 23 dargestellt. Aufgrund der kleinen Untersuchungsmenge konnte keine Aussage für den prädiktiven Wert des MGMT-Status auf das klinische Ansprechen getroffen werden.

Tab. 23: Korrelation der MGMT-Expression mit klinischem Ansprechen

Tumor Typ	MGMT-Färbung			
	n (%)	negativ, n (%)	mäßig positiv, n (%)	stark positiv, n (%)
PNEN	16 (100)			
PR	7 (43,7)	3 (42,9)	4 (57,19)	0
SD	5 (31,3)	3 (60)	1 (20)	1 (20)
PD	4 (25)	1 (25)	3 (75)	0
Nicht-PNEN	5			
PR	2	2	0	0
SD	2	1	1	0
PD	1	1	0	0
Alle NEN	21	11	9	1

5.5.2 DPD- und TS-Expression bei 5-FU-behandelten Patienten

Es wurden die Daten von Patienten mit pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien analysiert, die eine Kombinationstherapie aus STZ/5-FU erhalten hatten. In der 41 Patienten umfassenden Kohorte gab es 23 (56%) weibliche und 18 (44 %) männliche Patienten. Das Alter bei Diagnose lag mit einem Median von 54 Jahren zwischen 30 und 79 Jahren. 28 (68%) Patienten waren asymptomatisch und konnten ihre Aktivitäten wie vor der Erkrankung uneingeschränkt ausführen (ECOG Performance Status (PS) 0) (Oken *et al.*, 1982). 12 (29%) Patienten waren bei körperlicher Anstrengung eingeschränkt, waren jedoch konnten sie gehen und waren zu leichter körperlicher Arbeit fähig (PS 1). Bei einem (3%) Patienten konnte der PS aus den Akten nicht mehr ermittelt werden. Über drei Viertel der Patienten (78%) hatten funktionell-nicht-aktive Tumoren. Dem gegenüber standen 9 (22%) funktionell-aktive Tumoren, darunter 3 VIPome und jeweils 2 Gastrinome, Insulinome und Glucagonome. Abbildung 36 zeigt als Flowchart die Ursprungsgane der Tumoren.

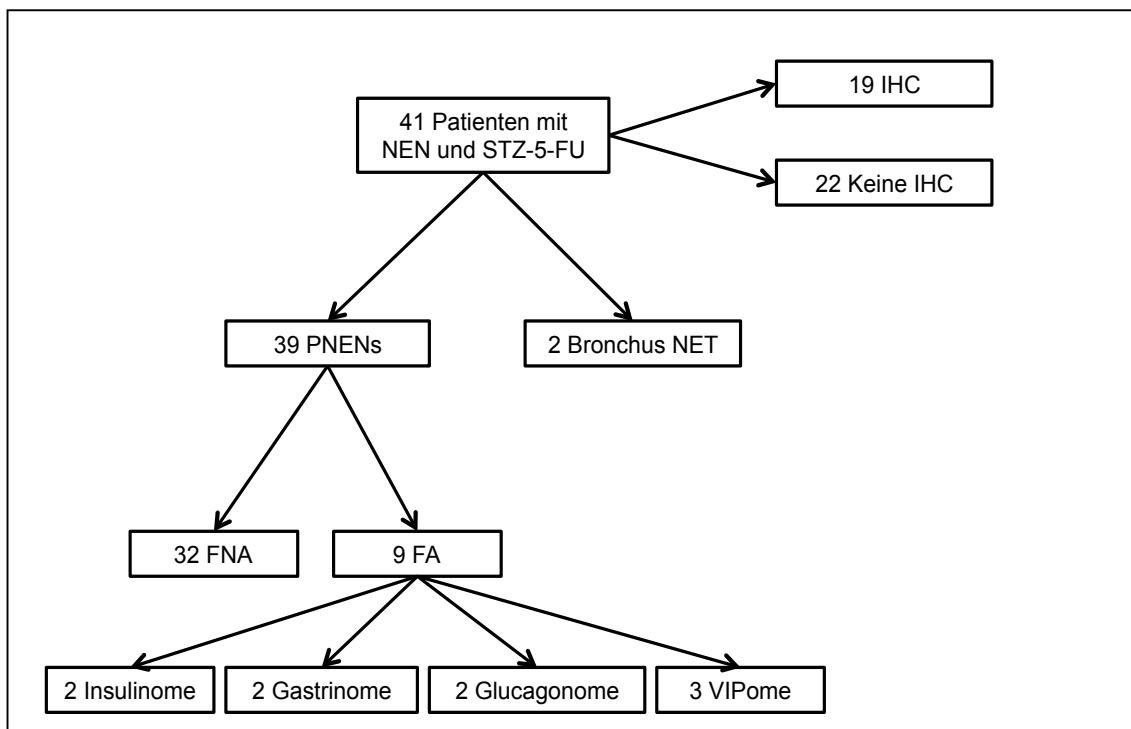


Abb. 36: Flussdiagramm zur Darstellung der retrospektiven Patientenrekrutierung

(P)NEN: (pankreatische) neuroendokrine Neoplasie, STZ-5-FU: Streptozotocin/5-Fluorouracil - Kombinationstherapie, ICH: Immunhistochemie, FNA: funktionell-nicht-aktiv, FA: Funktionell-aktiv

Mit 34 Patienten hatte der Großteil einen G2 Tumor (83%), 4 Patienten einen G1- (10%), 2 Patienten eine G3-PNEN (5%), und bei einem Patienten war das Grading unbekannt (2%). Bei knapp über der Hälfte (58%) der Patienten war eine primäre Tumoresektion durchgeführt worden. Das progressionsfreie Überleben von Patienten mit STZ/5FU-Therapie lag bei 23 Monaten. Das mediane Gesamtüberleben lag bei 50 Monaten und das kumulative Gesamtüberleben bei 106 Monaten. Von den insgesamt 41 Patienten waren bei 19 Patienten Gewebeproben vorhanden, die immunhistochemisch untersucht werden konnten.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte durch drei unabhängige Untersucher (W.N., S.K., M.B.) gemäß dem im Methodenteil beschriebenen Remmele-Stegner-Score. Abbildung 37 zeigt repräsentative Schnitte einer PNEN, die gegen DPD (obere Zeile) und gegen TS (untere Zeile) gefärbt wurden.

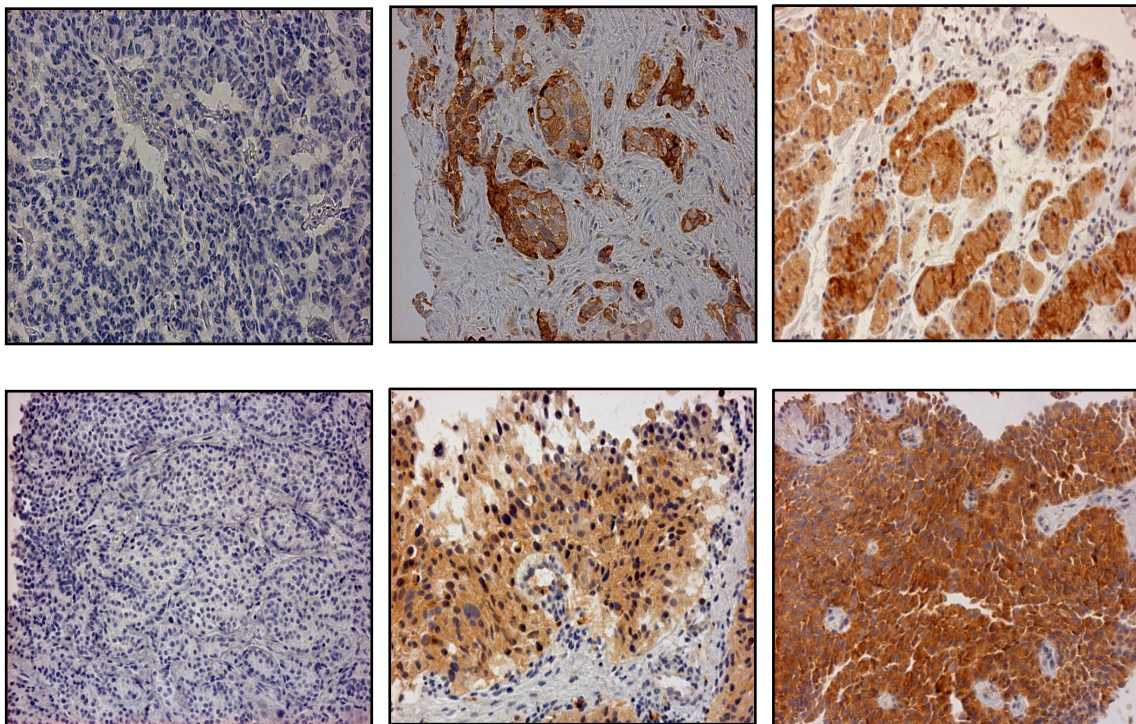


Abb. 37: Repräsentative Schnitte der gegen DPD (oben) und TS (unten) gefärbten Schnitte
Links: negativ, Mitte: niedrige Expression, rechts: hohe Expression.

Aufgrund der Verteilung der Absolutwerte bei DPD-Auswertung wurde als Cut-off ein Scorewert von 3 gewählt. Von den 19 Patienten, deren Probenmaterial vorhanden war, hatten 8 einen Scorewert von weniger als 3 und 11 Patienten einen Scorewert von größer als 3. Zur Analyse der Korrelation der beiden Marker mit der ORR und der DCR

wurden zwei Analyseverfahren angewendet. Bei dieser Art von Gruppenvergleichen der Fisher's exact test und χ^2 -Test zwei geeignete statistische Verfahren. Tabelle 24 zeigt, dass diese Tests für die DPD eine signifikante Korrelation mit der ORR ergaben (p-Wert Fisher's exact: 0,018; p-Wert χ^2 -Test: 0,012). Dies lässt eine Interpretation von DPD als möglichen prädiktiven Marker für das Ansprechen einer 5-FU-Therapie zu.

Tab. 24: Korrelation der DPD-Expression zum klinischen Ansprechen

		DPD		Fisher's exact test	χ^2 -Test
				p-Wert	
	n (%)	Niedrig < 3, n (%)	Hoch > 3, n (%)		
PNEN	19 (100)	8 (42,1)	11 (57,9)		
ORR		0 (0)	6 (54,5)	0,018	0,012
DCR		5 (62,5)	10 (90,9)	0,26	0,13

Für die Thymidylat-Synthase wurde ein Cut-off von 1 als höchstdiskriminierender Scorewert gewählt. Dies geschah basierend auf der Verteilung der Absolutwerte. 12 der 19 Patienten hatten eine niedrige Enzymexpression und 7 Patienten eine hohe Expression. Tabelle 25 zeigt die statistische Auswertung. Diese ergab im χ^2 -Test einen grenzwertig signifikanten p-Wert von 0,05 für die Korrelation der DCR mit der TS-Expressionshöhe.

Tab. 25: Korrelation der TS-Expressionshöhe zu klinischen Ansprechen

		TS		Fisher's exact test	χ^2 -Test
				p-Wert	
	n (%)	Niedrig < 0, n (%)	Hoch > 1, n (%)		
PNEN	19 (100)	12 (63,2)	7 (36,8)		
ORR		2 (16,7)	7 (58,3)	0,13	0,07
DCR		4 (57,1)	7 (100)	0,11	0,05

6 Diskussion

6.1 Bedeutung prädiktiver und prognostischer Marker in Zeiten personalisierter Medizin

Unser Verständnis molekularbiologischer Mechanismen und der dadurch getriggerten Progressionsdynamik von Tumoren hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert und zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien geführt. Mit der zunehmenden Aufklärung der zellbiologischen Signalwege wurde die Vorstellung der Pathogenese von Tumoren revolutioniert. Dieser neue Blickwinkel ermöglicht auch einen tiefgehenden Einblick in die Resistenzmechanismen eines Tumors gegenüber einer Therapiemaßnahme, sei es Radio- oder Chemotherapie. Als „personalisierte Medizin“ haben diese Ansätze Eingang in unseren ärztlichen Alltag gefunden.

Personalisierte Medizin ist eine evidenzbasierte, individualisierte Herangehensweise, welche eine Behandlung dem Patienten zuteilt und dadurch messbare Verbesserungen beim Therapieergebnis erzielt und die Gesundheitskosten verringert.

Klassische Chemotherapeutika sind häufig mit substantiellen und unter Umständen lebensbedrohlichen Nebenwirkungen verbunden. Biomarkerdiagnostik kann vorhersagen, ob bei einer bestimmten Patientengruppe diese belastende Medikation wegen genetischer Polymorphismen oder tumorbiologischer Eigenschaften gar keinen Effekt hat und somit dem Patienten mehr schadet als nützt. Diese Polymorphismen sind genetisch festgelegte Sequenzvariationen, die zu unterschiedlichen Phänotypen mit z.B. variabler Pharmakodynamik führen (Holohan *et al.*, 2013). Daneben existieren dem Tumor zugehörige molekularbiologische Eigenschaften, die Therapieansprechen antizipieren lassen. So beispielsweise pharmakologisch bedeutsame Signalwege, die vor der Gabe eines Medikaments analysiert werden, um dessen Wirksamkeit oder mögliches Ansprechversagen einzuschätzen. Mutationsanalysen von onkogen wirksamen Kinasen sind bei einigen Tumorentitäten schon standardmäßig im Therapiealgorithmus implementiert. Die Essenz der personalisierten Onkologie sind die eben genannten Biomarker, die aus Gewebe, Serum oder Urin gewonnen werden können (Drucker und Krapfenbauer, 2013). Diese Biomarker können z.B. für das Ansprechen einer Therapie prädiktive Aussagekraft besitzen oder als prognostischer Marker über den Krankheitsverlauf Aufschluss geben.

Methodisch fußt die personalisierte Medizin in Genomanalysen und molekulargenetischer Diagnostik zur Patientenstratifizierung, um Krebsmedikamente oder „targeted therapies“ jedem Patienten zuzuordnen. Diese Methoden lösen somit mehr und mehr frühere Therapieansätze ab, bei denen es für alle Patienten eine Therapie gab.

In den kommenden Jahren wird sich so die Krebstherapie von einem reaktiven zu einem proaktiven Ansatz verändern. Der Gebrauch molekularer Diagnostik wird in Zukunft weiter deutlich zunehmen und integraler Bestandteil bei der Behandlung von Tumorkranken werden.

6.2 CUX1 als Biomarker

Die Rolle des Transkriptionsfaktors CUX1 als wichtiger Vermittler maligner Transformation im dukталen Pankreaskarzinom (PDAC) ist bereits vielfach untersucht und auch in dieser Arbeit besprochen worden. Im Rahmen der Karzinogenese spielt CUX1 eine Schlüsselrolle für Tumordinvasion, Apoptoseresistenz sowie Angiogenese über unterschiedliche Signalwege (Michl *et al.*, 2005). Welche Effekte CUX1 in neuroendokrinen Tumoren hat und welche Anwendbarkeit dies klinisch haben könnte, ist eine Kernfrage dieser Arbeit.

Die Xenograft-Tumoren der geopfertten Tiere wurden hinsichtlich der Parameter Volumen, Proliferation, Nekrosen und Neovaskularisation untersucht. Zur quantitativen Erhebung der Proliferation wurde gegen das Ki-67-Antigen (Kiel, Klon-67) gefärbt (Gerdes *et al.*, 1983). Das nukleäre Ki-67-Antigen wird während der aktiven Phasen der Mitose (S-, G1-, G2- und M-Phase) von normalen und neoplastischen Zellen exprimiert. Einzig in quieszenten Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, ist das Antigen nicht zu finden (Scholzen und Gerdes, 2000). Die Ki-67 positiv gefärbten Zellkerne entsprechen somit der „Wachstumsfraktion“ des Tumors (Gerdes *et al.*, 1984). In CUX1-überexprimierenden Tumoren war die Expression von Ki-67 höher als in der Kontrollgruppe. Die so erhobene Proliferationsinduktion durch CUX1 bestätigt *in vivo* die bekannten proliferativen Effekte, die speziell auch im Pankreaskarzinom gut untersucht sind (Michl *et al.*, 2005). Insbesondere die CUX1p110-Isoform wurde als entscheidender Mediator dieses Phänotyps charakterisiert, vermittelt durch die Expressionsinduktion von Zielgenen, die an Zellzyklusprogression, DNA-Replikation und Proliferation beteiligt sind (Harada *et al.*, 2008). In unseren Experimenten erfolgte die Überexpression der p200-Isoform, sodass hier von einem anderen Mechanismus auszugehen ist. Bei neuroendokrinen Neoplasien stellt die Proliferation, ebenfalls mittels Ki-67 erhoben, in der Klinik das entscheidende Klassifikationskriterium für das Grading dar. Dieses wiederum ist ausschlaggebend für die Auswahl der optimalen Therapie. Studien legen nahe, dass Proliferation – als ein „Hallmark of Cancer“ (Hanahan und Weinberg, 2000) – bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien ein wichtiges Merkmal zur Vorhersage maligner Transformation sein kann. Deshalb ist anzunehmen, dass die CUX1-Expressionshöhe, als Vermittler eines proliferativen Phänotyps in pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien, prognostischen Charakter besitzt. Hierbei ist eine klare Korrelation zwischen Proliferation und Überleben belegt worden (Pan-zuto *et al.*, 2011; Scarpa *et al.*, 2010).

In den Analysen der HE Färbungen ergab sich eine signifikante Reduktion der Nekroseareale im Vergleich zu den Xenografttumoren, die aus Leervektor transfizierten Zellen gewachsen waren. Krug *et al.* haben *in vitro* Studien einen proangiogenen Phänotyp der Bon1-Zellen charakterisiert (Krug *et al.*, 2014). Hinsichtlich der Reduktion der Nekroseareale stellt eine verbesserte Vaskularisierung durch verstärkte Angiogenese einen möglichen Erklärungsansatz dar.

1971 postulierte Judah Folkman erstmals, dass das Wachstum eines soliden Tumors entscheidend von der Bildung neuer Gefäße abhängt (Folkman, 1971). Ein funktionierendes Gefäßnetz gewährleistet die ausreichende Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport anfallender metabolischer Endprodukte (Fidler, 1994). Sauerstoffdiffusion ist, bezogen auf die Distanz, begrenzt und führt somit ab einem Tumolvolumen von 2-3 mm³ zu Hypoxie im Tumor, was über Ausschüttung verschiedenster proangiogener Zytokine zur Ausbildung neuer Endothelzellen führt (Neufeld und Kessler, 2006). Dieser als „angiogenic switch“ bekannte Schritt von vaskulärer Quieszenz zu proangiogener Aktivität stellt einen tumorbiologischen Wendepunkt dar und macht expansives Tumorstadium erst möglich (Bergers und Benjamin, 2003; Holland, 2000). Für neuroendokrine Neoplasien ist eine starke Vaskularisierung charakteristisch (Turner *et al.*, 2003). Daher werden auch heute schon antiangiogene Behandlungskonzepte bei der medikamentösen Therapie angewendet. So beispielsweise mittels Inhibition des mammalian target of rapamycin (mTOR) innerhalb des Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signalweges (Yim, 2012). Everolimus, ein mTOR-Inhibitor, führte in der Phase III der RADIANT-3 Studie zu signifikanter Verlängerung des progressions-freien Überlebens (Yao *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2011). Sehr gute Ergebnisse hinsichtlich verbessertem, progressionsfreiem Überleben, Gesamtüberleben und der objektiven Ansprechrates konnten auch mit Sunitinib erreicht werden (Faivre *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2011). Um die Angiogenese zu quantifizieren, sollten die Tumoren der beiden Xenograftgruppen hinsichtlich ihrer CD31-Expression evaluiert werden. CD31 (cluster of differentiation 31), auch bekannt als PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), gehört zur Familie der Immunglobuline. Dieses 130-kDa schwere transmembranäre Glykoprotein wird auf der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und ist wichtiger Bestandteil interzellulärer Verbindungen des Endothels. Daneben spielt das Protein auch eine Rolle bei der Leukodiapedese im Rahmen inflammatorischer Prozesse (Pusztaszeri, 2006). Leider lieferten die Färbungen zur Analyse der Gefäßneubildung Ergebnisse unbefriedigender Sensitivität und Spezifität. Zur Färbung

verwendet wurde ein Antikörper, gerichtet gegen das CD31-Maus Antigen. Nachdem sich mit diesem Antikörper keine befriedigenden Ergebnisse erzielen ließen, wurde die Färbung exemplarisch mit einem gegen das humane Antigen gerichteten Antikörper wiederholt. Auch diese Färbung lieferte Ergebnisse, die nicht den gängigen Standards und Anforderungen entsprachen. Deshalb muss hier die Frage diskutiert werden, welchen Ursprungs die intratumoral neugebildeten Gefäßzellen sind. Es ist bekannt, dass Tumorzellen, insbesondere Tumorstammzellen (CSC), die Fähigkeit zur Reprogrammierung und somit zur Transdifferenzierung in andere Zelltypen besitzen. Für das Melanom (Monzani *et al.*, 2007) und das Glioblastom (El Hallani *et al.*, 2010; Soda *et al.*, 2011) konnte eine Expression von spezifisch angiogenen Markern nachgewiesen werden, was eine Transdifferenzierung in Endothelzellen nahelegt. Bei den subkutan injizierten Zellen handelte es sich um die Bon1-Zellen, die humanen Ursprungs sind. Diese Art phänotypischer Plastizität ist bei der eingespritzten Zelllinie eher unwahrscheinlich, da es sich um eine ausdifferenzierte Tumorzellpopulation handelt, dennoch ist auch da eine Transdifferenzierung nicht auszuschließen. Möglicherweise werden die Gefäße von chimären Endothelzellen gebildet. Dies sind Gefäße, die Endothelzellen humanen und murinen Ursprungs enthalten. Zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen mit anderen Antikörpern sind also sinnvoll. Möglich wären diese beispielsweise mit dem in angiogenen Endothelzellen exprimierten Endoglin (CD 105), einem gut charakterisierten Protein, welches sich durch seine Assoziation mit Proliferation und Induzierbarkeit durch Hypoxie auszeichnet (Duff *et al.*, 2003). Alternativen wären Antikörper gegen CD34 und MECA-32, spezifisch für Mausendothelien. Im Hinblick auf das therapeutische Potential müssen weitere Experimente bezüglich der Verknüpfung von CUX1 mit Proliferation und Angiogenese folgen.

Nachdem Arbeiten unserer Forschungsgruppe CUX1 als Modulator wichtiger protumorigenen Eigenschaften identifiziert hatten, untersuchten wir die CUX1-Expression in einer klinischen Kohorte von humanen PNEN-Proben.

Die Mehrzahl der Patienten mit neuroendokrinen Tumoren des Pankreas war bereits metastasiert und nicht mehr resektabel, sodass eine Chemotherapie notwendig war.

In den Tumorproben der Patienten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der CUX1-Expression in Primarien oder der CUX1-Expression in Metastasen erhoben werden. Wie schon bei den Insulinom-MTA (Krug *et al.*, 2014) zeigte sich auch bei der aktuellen Analyse in pankreatischen neuroendokrinen Tumoren keine Korrelation des CUX1-IRS mit dem Proliferationsindex Ki-67.

Anschließend folgte die Untersuchung hinsichtlich klinischer Zielgrößen wie dem PFS und dem OS. Während die erhöhte CUX1-Expression mit einem kürzeren PFS assoziiert war, zeigten sich keine Veränderungen bezogen auf das OS. CUX1 besitzt daher möglicherweise eine prädiktive Eigenschaft in diesem Kollektiv von Patienten mit fortgeschrittenem PNEN unter Chemotherapie. Um weiterhin herauszufinden, wie dieser starke Zusammenhang zustande kommt, untersuchten wir, welche Beziehung zwischen CUX1 und der Disease Control Rate besteht. Gewebe von Patienten, deren Erkrankung sich entweder komplett oder teilweise zurückgebildet hat oder stabil geblieben ist, wies durchschnittlich einen signifikant geringeren Remmele-Stegner-Scorewert auf als Gewebe von Patienten, deren Erkrankung progredient verlief. Für die ORR ergab sich keine Korrelation mit der CUX1-IRS.

Die starke Korrelation von CUX1 mit dem PFS wird durch die Assoziation mit der DCR vermittelt. Vor dem Hintergrund, dass CUX1 in PNEN ein wichtiger Vermittler maligner Eigenschaften wie Metastasierung oder Proliferation ist, erscheint dies nachvollziehbar (Krug *et al.*, 2014). Es handelt sich hier um zwei unabhängige Kollektive humaner PNEN, was die Aussagekraft der Untersuchungen und den prädiktiven Charakter des Transkriptionsfaktors nochmals unterstreicht. Da es sich bei diesen Untersuchungen um retrospektive Analysen handelt, müssen bis zu einer Implementierung in die klinische Praxis noch randomisiert kontrollierte Studien folgen.

6.3 CUX1-regulierte miRNAs

Die prädiktive und prognostische Bedeutung von miRNAs wurde in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt. MiRNAs und neuroendokrine Neoplasien waren ebenfalls bereits Gegenstand der Forschung: Eine Vielzahl von onkogenen und suppressiven miRNAs wurden in PNEN und gastrointestinalen NEN identifiziert, die möglicherweise für den klinischen Verlauf einen Vorhersagewert besitzen (Roldo *et al.*, 2006; Ruebel *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013b; Luzi und Brandi, 2011). In einer Studie wurden die miRNA-Expressionsmuster des normalen Pankreas mit denen von PNEN und azinären Karzinomen verglichen. Eine fehlende Expression der miR-155 bei gleichzeitiger Expression der miR-103 und 107 machte eine Unterscheidung der Tumoren von den normalen Pankreata möglich. Charakteristisch für die gut differenzierten Insulinome war die Expression der miR-204, welche immunhistochemisch mit der Insulinproduktion korrelierte. Eine Überexpression von miR-21 war ebenso positiv mit der Proliferationsfraktion (Ki-67) und mit dem Auftreten von Lebermetastasen assoziiert (Roldo *et al.*, 2006). PTEN, ein Zielgen der miR-21, legt eine Verbindung zum mTOR Signalweg nahe (Zhang *et al.*, 2010). In einer weiteren Studie war die verringerte extrazellulär zirkulierende miR-1290-Konzentration Hinweisgeber zur Unterscheidung von PNEN gegenüber gesunden Kontrollen (Li *et al.*, 2013a). Weitere neuere Expressionsprofilstudien zeigten Anhaltspunkte von miRNA-Dysregulation bei progredienten Ileum-NEN. Ruebel *et al.* von der Mayo Clinic sahen einen Zusammenhang zwischen miRNA-133a Repression und der Progression von Ileum-NEN von lokalisierter Erkrankung zu maligner Erkrankung (Ruebel *et al.*, 2010; Vicentini *et al.*, 2014).

Nach dem Screening mittels Profilkarte wurde zur individuellen Validierung unserer Ziel-miRNAs die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) als Methode verwendet. Dabei handelt es sich um den Goldstandard für die Quantifizierung der Genexpression (Livak und Schmittgen, 2001; Heid *et al.*, 1996). Das angewendete Verfahren unter Verwendung von sogenannten stem-loop RT Primern besitzen gute Sensitivität und Spezifität (Chen *et al.*, 2005). Da die primerspezifische qRT-PCR eine viel höhere Spezifität und Sensitivität besitzt als das Profiling, welches mit sogenannten Primerpools durchgeführt wird, erklären sich die teils vom Profil stark abweichenden Ct-Werte. Als entscheidend sahen wir in diesem Zusammenhang vor allem die Reproduzierbarkeit der Regulationstendenz. Um zufallsbedingte Ergebnisse auszuschließen, wurden die Experimente an drei unterschiedlichen biologischen Replikaten durchgeführt, die standardisiert unter exakt gleichen Bedingungen gewachsen waren.

Wie im Ergebnisteil dargestellt, unterschieden sich die Replikate zum Teil in mehreren Zehnerpotenzen. Aus diesem Grund konnten die Rohwerte der Replikate nicht gemittelt und mit der Standardabweichung dargestellt werden. Einheitliche Regulation von mindestens einem Klon wurde in allen drei Replikaten für die miR-1296 gesehen. Zur anschaulichen Darstellung der CUX1-Abhängigkeit wurden die Ratios gebildet.

Da *in vitro* Experimente mit überexprimierenden Zellen in ihrer Aussagekraft artifiziell und dadurch begrenzt interpretierbar sind, wurde die miRNA-Expression auch in CUX1-Knockdown-Zellen untersucht. Dort erwarteten wir eine zur Ratio der CUX1/Mock-Zellklone inverse Korrelation. Um dort die Wahrscheinlichkeit von off-target Effekten zu minimieren, wurde der Knockdown mit drei unterschiedlichen siRNAs durchgeführt.

Es zeigte sich für keine der in dem Profil ausgewählten miRNAs eine Expression, welche nach CUX1-Überexpression und CUX1-Knockdown konsistent gegenläufig war. So muss davon ausgegangen werden, dass die von CUX1-vermittelten Effekte wahrscheinlich nicht durch eine Regulation von miRNAs vermittelt wird.

6.4 Therapieansprechen und Enzymexpression

6.4.1 Dacarbazin und MGMT

Dacarbazin (DTIC) ist als Monotherapie eine Therapieoption beim Nichtansprechen der First-Line Chemotherapie bei pankreatischen G1/G2 NEN. Besonderer Vorteil einer Monotherapie von DTIC ist die Möglichkeit, diese ambulant durchzuführen, was in der palliativen Behandlung vorzuziehen ist. Die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Alkylantien ist erhöht, je niedriger die Expressionsstärke des Reparaturenzyms MGMT ist, welches die durch Chemotherapie induzierten Apoptose verhindern kann. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom oder Glioblastom, die eine Therapie mit Temozolomid, dessen Prodrug DTIC ist, erhalten haben, war eine geringere intratumorale MGMT-Expression mit einer Verlängerung des Gesamtüberlebens assoziiert (Hegi *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 1998; Chinot *et al.*, 2007; Brandes *et al.*, 2006).

Das Chemotherapeutikum Dacarbazin wird auch bei progressiven pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien eingesetzt. In vorangegangenen Studien zeigten sich Ansprechraten von ca. 30% (Ramanathan *et al.*, 2001; Altimari *et al.*, 1987; Bajetta *et al.*, 1998). Diese als Alkylantien bekannten zytostatischen Substanzen bewirken eine Vernetzung (Cross-linking) gegenüberliegender Basenpaare und daraus resultierende Strangbrüche. Natürliche Schadenskontrollmechanismen (DNA damage response pathways) können daraufhin über Kinasen an Zellzyklus-Checkpoints (Chk1, Chk2) beispielsweise p53 oder p21 aktivieren, die über Effektoren entweder zu Apoptose, Zellzyklusarrest, Transkription oder zur Aktivierung von Reparaturenzymen führen (Elledge und Zhou, 2000; Liu und Gerson, 2006). In Abhängigkeit von der Art und Ursache des DNA-Schadens werden unterschiedliche Reparatursysteme induziert. Die MGMT, als Teil dieses Reparatursystems, ist in der Lage eine Rückkonvertierung alkylierter Basen vorzunehmen. Bei diesem System spricht man von Reversions-Reparatur (RER) (Murken, 2011). Der therapeutisch erwünschte, zytotoxische Effekt kann durch solche Mechanismen konterkariert bzw. bei geringerer Enzymexpression verstärkt werden. Die Fähigkeit des natürlichen Reparaturenzyms MGMT, einer therapeutischen Wirkung von O⁶-Methylguanin entgegenzuwirken, scheint bei der Ausbildung von Resistenzen gegenüber therapeutischer Substanzen mit alkylierender Wirkung beteiligt zu sein. Die Expressionshöhe und damit der Wirkungsgrad der MGMT kann genunabhängig reguliert werden. Epigenetische Mechanismen wie die Methylierung von Promotoren sind Kernmechanismen posttranslationaler Kontrolle der Genexpression (Herman und Baylin, 2003). Die Methylierung findet an CpC (Cytosinphosphatidyl Guanin)-Dinukleotiden

statt und führt zum Silencen der Genexpression, was im Fall von Tumorsuppressoren zu aberranter Zellzyklusregulation führt. Gleiches ist bei MGMT der Fall. Die Methylierung des Promotors hat vor allem bei am Glioblastom erkrankten Patienten gezeigt, dass der klinische Verlauf einer kombinierten Therapie von alkylierenden Substanzen und Strahlentherapie besser sein kann (Jakob *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Neben DTIC induzieren auch andere alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid und Streptozotocin (STZ) eine Methylierung an der O⁶-Position des Guanins (Bennett und Pegg, 1981; Souliotis *et al.*, 1991; Newell *et al.*, 1987; Gerson, 1989). Um nicht nur das Genprodukt selbst zu evaluieren, sondern auch dessen Silencing, kann die methylierungsspezifische PCR geeignet sein, die den Methylierungsstatus von CpG Inseln aufzeigt und somit direkt einen Nachweis der epigenetischen Modifikation leisten kann. In einer Studie von House *et al.* wurden gut differenzierte pankreatische endokrine Neoplasien in Methylierungsspezifischer PCR (MSP) untersucht, um eine abweichende Promotormethylierung von 11 Ziel-Tumorsuppressor-Genen zu untersuchen. Der Methylierungsstatus der MGMT war bei 40% der Patienten positiv und stellte sich als prädiktiv für das Therapieansprechen heraus (House *et al.*, 2003). Kulke und Kollegen haben in einer retrospektiven Studie immunhistochemisch die MGMT-Expression von pankreatischen und Midgut-NEN verglichen. Dabei fanden sie nicht nur, dass pankreatische NEN häufiger MGMT-defizient waren, sondern auch, dass diese direkt mit dem Ansprechen auf Temozolomid, dem oralen Prodrug von DTIC, assoziiert war (Kulke *et al.*, 2009; Ekeblad *et al.*, 2007).

Mit einem Anteil von 66% der Patienten, die eine Partial Response und eine Stable Disease aufwiesen, hat sich in unserer retrospektiven Analyse DTIC als wirksame Therapie bei Patienten mit progredienten gut differenzierten Pankreas-NEN bestätigt. In der immunhistochemischen Analyse konnte eine MGMT-Defizienz ein Therapieansprechen jedoch nicht zuverlässig vorhersagen.

6.4.2 5-FU und DPD/TS

Das untersuchte Therapieregime ist eine alte Kombinationstherapie, die bereits seit über 30 Jahren existiert (Moertel *et al.*, 1980). Über den langen Zeitraum hinweg hat sie sich bis heute bewährt und hat auch in die ENETs Leitlinien von 2012 Eingang gefunden. So entspricht die Kombinationstherapie STZ/5-FU bei gut differenzierten G1 und G2 Tumoren mit inoperablen hepatischen Metastasen nach wie vor dem heutigen Goldstandard (Pavel *et al.*, 2012). Die Studienlage bei 5-FU-basierten Therapien ist limitiert, zeigt jedoch Ansprechraten von ca. 30-40% (Moertel *et al.*, 1980; Moertel *et*

al., 1992; Eriksson *et al.*, 1990a; Kouvaraki *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2010). Diese Studien sind aber mit relativ geringeren Patientenzahlen (maximal 42 Patienten) und den fehlenden, vormals nicht standardmäßig verwendeten RECIST-Kriterien verbesserungswürdig. Deswegen war es Ziel dieser unizentrischen Studie, alte Erkenntnisse zu reevaluierten und neue Erkenntnisse zu gewinnen. 33% der Patienten unter dieser Therapie hatten eine Objective Response (OR) und 77% eine Disease Control (DC). Die Aussagekraft der beiden mit dem 5-FU-Metabolismus verknüpften Enzyme Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) und Thymidylatsynthase (TS) sollte ebenfalls untersucht werden.

Die prädiktive Aussagekraft der Quantifizierung der TS und DPD bei Patienten, deren Tumorerkrankung mit 5-FU behandelt wurde, konnte im Rahmen einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden. Dass die TS-Expression eine Schlüsselrolle für die 5-FU Sensitivität hat, wurde bereits 1992 von Johnston *in vitro* gezeigt (Johnston *et al.*, 1992). Insbesondere für das Kolonkarzinom wurde ein verbessertes Ansprechen der 5-FU-Therapie bei Patienten mit niedriger TS (Lenz *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 1995) und ein schlechteres klinisches Outcome bei hoher TS-Expression gezeigt (Edler *et al.*, 2002; Edler *et al.*, 2000).

Obwohl 5-FU bei neuroendokrinen Neoplasien als Chemotherapeutikum gebräuchlich ist, sind Studien hinsichtlich der Aussagekraft von TS-Expressionshöhe limitiert. Ceppi *et al.* haben in ihrer 2008 veröffentlichten Studie Gewebeproben von 24 Patienten mit gut differenzierten gastro-entero-pankreatischen neuroendokrinen Tumoren untersucht, die mit einer 5-FU-basierten Chemotherapie behandelt wurden. Neben der Proteinexpression in Immunhistochemie wurde auch die RNA-Expression der TS mittels Real-Time-PCR analysiert. Hohe TS-Expressionslevel waren mit einer schlechteren Prognose (frühere Rezidive und kürzerer Gesamtüberlebenszeitraum) assoziiert (Ceppi *et al.*, 2008). Ebenfalls auf Protein- und RNA-Level verglichen Nagasaki und Kollegen die TS-Expression in großzelligen neuroendokrinen Karzinomen (LCNEC; n=31) im Vergleich zu epithelialen Tumoren der Lunge. Die Tumoren wiesen in dieser Untersuchung signifikant höhere TS-Level auf als die Vergleichsgewebe. Die klinisch-pathologische Datenanalyse zeigte, dass Enzymexpression keinen prädiktiven Charakter für zukünftiges Malignitätsverhalten von NEC hatten (Nagasaki *et al.*, 2010). Die Vorhersagekraft der TS für die Prognose (Ansprechraten und Überleben) bei nicht vorbehandelten Patienten mit progressiven, metastasierten GEP-NEN, die mit Streptozotocin behandelt wurden, konnte ebenfalls erwiesen werden (O'Toole *et al.*, 2010a). In einer großen Studie

mit 320 humanen Proben wurde die klinische Bedeutung der TS-Expression in GEP-NEN untersucht. 78 der 320 GEP-NEN (24,4%) exprimierten TS, wobei in Kolon (47,4%) Magen (42,6%) und Pankreas (37,3%) die meisten TS-positiv waren. Die Expressionshöhe war assoziiert mit schlechterer Differenzierung, Lymphgefäßinvasion sowie Metastasierung. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens hatten TS-positive einen deutlich schlechteren Verlauf als TS-negative NEN-Patienten (Lee *et al.*, 2014).

In unserer Untersuchung korreliert eine hohe TS-Expression bei Patienten, die mit STZ/5-FU therapiert wurden, mit der DCR und dem PFS. Die Datenlage ist nicht eindeutig, ob eine niedrige oder hohe TS-Expression mit einer Prognoseverbesserung assoziiert ist. Dass Tumoren mit niedrigen TS-Levels mit verbessertem Überleben assoziiert sind, wurde vielfach immunhistochemisch gezeigt (Johnston *et al.*, 1995; Edler *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2007). Dem könnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber der 5-FU-Therapie zugrunde liegen. Eine Reihe anderer Studien haben gezeigt, dass sich erhöhte TS-Level begünstigend auf das Ansprechen einer 5-FU-Therapie auswirken können (Edler *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 1994). Auch in unserer Untersuchung hat eine höhere TS-Expression eine Assoziation mit der Krankheitskontrolle gezeigt. Da die TS eine der drei Hauptzielstrukturen ist, mit denen 5-FU ihre Wirkung entfaltet, kann postuliert werden, dass das Medikament besonders gut wirkt, wenn dieses Zielenzym auch hoch exprimiert wird.

Fest steht, dass aufgrund der unterschiedlichen Studienergebnisse eine alleinige TS-Evaluierung keine zuverlässige Aussagekraft besitzt, sondern eine Kombination verschiedener Biomarker vorgenommen werden muss. Zukünftige Untersuchungen müssen also folgen, die idealerweise ihre Ergebnisse auf mindestens zwei Ebenen (Protein und RNA) zeigen.

Die Bioverfügbarkeit von 5-FU wird durch DPD direkt beeinflusst (Diasio und Harris, 1989b). Genetisch bedingte Inaktivität dieses Enzyms führt bei den betroffenen Patienten zu folgenreichen toxischen Nebenwirkungen (Johnston *et al.*, 1999).

Die DPD-Expression und deren Assoziation mit dem klinischen Ansprechen auf eine 5-FU-Therapie ist in unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht worden. Diese Studien zeigen eine eindeutige Korrelation von hoher DPD-Expression mit erhöhter 5-FU-Resistenz bzw. schlechter Prognose. Man geht davon aus, dass niedrige DPD-Level die Bioverfügbarkeit dieses Medikaments erhöhen und damit das Ansprechen verbessern. Beim Magenkarzinom (Ishikawa *et al.*, 2000) und beim CRC (McLeod *et al.*,

1998) erwies sich die DPD als Prädiktor für das Ansprechen auf eine 5-FU-Therapie. Patienten mit niedriger Expression hatten ein signifikant längeres Gesamtüberleben als Patienten mit hohen Expressionswerten dieses Gens (Salonga *et al.*, 2000). Zur Verbesserung der Effektivität der 5-FU-Therapie wurden bereits präklinisch und klinisch DPD-Inhibitoren getestet, die einen guten Effekt gezeigt haben (Diasio, 1998b; Adams *et al.*, 1999). Da Tumoren unterschiedlich hohe DPD-Aktivität zeigen, sind 5-FU-Spiegel nur schwer berechenbar (Jiang *et al.*, 1997). Um die volle pharmakokinetische Kontrolle darüber zu besitzen, wurde bereits ein Inhibitor verwendet, der zu einer maximalen Inaktivierung der DPD-Funktion führt (Diasio, 1998a). Bei angepasster Dosierung kann so auch die systemische Toxizität und die therapeutische Effektivität von 5-FU besser kontrolliert werden (Diasio, 1999).

In der hier vorliegenden Studie korrelierte eine hohe DPD-Expression mit signifikant besserem Ansprechen auf 5-FU. In zwei unterschiedlichen statistischen Verfahren (Fisher's exact test und Chi-Quadrat-Test) konnte eine Korrelation zwischen der Expressionshöhe des Enzyms und der objektiven Ansprechrate (ORR) gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht der weitestgehend eindeutigen Literatur entgegen. Eine hohe intratumorale DPD-Aktivität führt dazu, dass der Großteil von 5-FU inaktiviert und als F-beta-Alanin über den Urin ausgeschieden wird (Omura, 2003). Das reduziert den erwünschten zytotoxischen Effekt dieses Medikaments maßgeblich. Einzig bei ausschließlich chirurgisch therapierten Patienten gibt es Hinweise für die Assoziation von hohen DPD-Werten mit besserem Überleben (Tsuji *et al.*, 2004). Die gegensätzlichen Beobachtungen könnten durch die methodischen Limitationen der Immunhistochemie mit variabler Antikörper-Spezifität und unspezifischer Antikörperbindung verursacht sein.

6.5 Limitationen

Zur Identifizierung neuer Marker dient häufig die Immunhistochemie. Auch im klinischen Alltag wird die Expression dieser Marker dann immunhistochemisch evaluiert. In unseren Untersuchungen war diese Methode ebenfalls eine wichtige Säule, weshalb die möglichen Fehlerquellen dieser Methode hier diskutiert werden müssen.

Umfassende Sequenzierungsanalysen haben ausgedehnte interindividuelle Heterogenität von molekularbiologischen Alterationen bei soliden Tumoren offengelegt (Parsons *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008; Sjoblom *et al.*, 2006). Doch auch intratumoral konnten Unterschiede gezeigt werden, die einen möglichen negativen Beitrag zu Therapieresistenz und fehlendem Ansprechen leisten können (Campbell *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Dies hat Konsequenzen für die Ansätze der personalisierten Medizin, da histopathologische Proben in der Regel auf einzelnen Biopsien basieren. Gerlinger *et al.* zeigten 2012, dass eine einzige Tumorbioptie nur einen Bruchteil der genetischen Veränderung einschließlich Mutationen, allelischer Dysbalancen, Genexpression sowie metastatischem und proliferativem Verhalten aufdecken kann (Gerlinger *et al.*, 2012). Gleiche Probleme ergeben sich bei der Charakterisierung neuer Biomarker für das Therapieansprechen und die Prognose, die auf immunhistochemischen Verfahren und Auswertungen basiert. Daneben haben immunhistochemische Methoden noch weitere Fehlermöglichkeiten wie Kreuzreaktivitäten, Probleme bei der Antigendemaskierung, Trocknungs- und Färbeartefakte. Diese Einflussgrößen konnten in unseren Untersuchungen jedoch durch standardisierte Färbung, die zum Großteil mit Hilfe eines Autostainers durchgeführt wurden, minimiert werden. Einer möglichen Verzerrung durch die Auswertung wurde durch Verblindung mehrerer unabhängiger Untersucher entgegengewirkt. Als Scoring System wurde der immunreaktive Score nach Remmele und Stegner verwendet, der ursprünglich zum immunhistochemischen Hormonrezeptornachweis in Mammakarzinomgewebe entwickelt wurde (Remmele und Stegner, 1987).

Zusätzlich ist die Vergleichbarkeit innerhalb des Gewebematerials nur bedingt gegeben, da die Proben von unterschiedlichen Ursprungsgeweben stammen. Pankreatische, Midgut- und Bronchus-Tumoren wurden genauso eingeschlossen, wie Hindgut und Magen NEN. Diese Heterogenität der Patientenkohorte erschwert auch die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf andere Patientenkohorten. Neben Primariusresektaten wurden auch Biopsien von Metastasen eingeschlossen. Dass sich diese tumorbiologisch unterscheiden, ist hinlänglich bekannt. Wie bereits im Ergebnisteil hingewiesen wurde, haben Patienten in der Regel eine Vorbehandlung erhalten. Diese zum Teil

sehr unterschiedlichen zytotoxischen Therapien können ebenfalls zu somatischen Mutationen führen, was sich in einer Expressionsänderung einzelner Enzyme äußert. Um die in diesem Abschnitt beschriebenen möglichen Fehlerquellen zu minimieren, müssen randomisierte kontrollierte Studien folgen.

Bei unseren Untersuchungen der Patientendaten handelt es sich um retrospektive Analysen. Dieses Studiendesign hat den Nachteil, dass nicht alle Einflussgrößen kontrolliert werden können, die möglicherweise zu einem Bias führen. Wegen des retrospektiven Aspekts kann es zum Selection Bias oder Information Bias kommen. So ist auch eine Interpretation von Kausalzusammenhängen nicht möglich, da ein Confounder, also eine dritte, vermittelnde Größe nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem waren einige Informationen in den teilweise alten Unterlagen nicht enthalten.

7 Literaturverzeichnis

- Adams ER, Leffert JJ, Craig DJ, Spector T, Pizzorno G (1999). In vivo effect of 5-ethynyluracil on 5-fluorouracil metabolism determined by ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res.* 59:122–127.
- Ai W, Toussaint E, Roman A (1999). CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J. Virol.* 73:4220–4229.
- Altimari AF, Badrinath K, Reisel HJ, Prinz RA (1987). DTIC therapy in patients with malignant intra-abdominal neuroendocrine tumors. *Surgery* 102:1009–1017.
- Amirmostofian M, Pourahmad Jaktaji J, Soleimani Z, Tabib K, Tanbakosazan F, Omrani M et al. (2013). Synthesis and Molecular-cellular Mechanistic Study of Pyridine Derivative of Dacarbazine. *Iran J Pharm Res* 12:255–265.
- Arnold CN, Sosnowski A, Schmitt-Gräff A, Arnold R, Blum HE (2007). Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int. J. Cancer* 120:2157–2164.
- Auböck L, Höfler H (1983). Extraepithelial intraneural endocrine cells as starting-points for gastrointestinal carcinoids. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 401:17–33.
- Bajetta E, Rimassa L, Carnaghi C, Seregni E, Ferrari L, Di Bartolomeo M et al. (1998). 5-fluorouracil, dacarbazine, and epirubicin in the treatment of patients with neuroendocrine tumors. *Cancer* 83:372–378.
- Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297.
- Bennett RA, Pegg AE (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 41:2786–2790.
- Bergers G, Benjamin LE (2003). Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401–410.
- Bijnsdorp IV, Comijn EM, Padron JM, Gmeiner WH, Peters GJ (2007). Mechanisms of action of FdUMP[10]: metabolite activation and thymidylate synthase inhibition. *Oncol. Rep.* 18:287–291.
- Borazan E, Aytakin A, Yilmaz L, Elci M, Karaca MS, Kervancioglu S et al. (2015). Multifocal Insulinoma in Pancreas and Effect of Intraoperative Ultrasonography. *Case reports in surgery* 2015:375124.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, Reni M, Franceschi E, Bonaldi L et al. (2006). Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J. Clin. Oncol.* 24:4746–4753.
- Bukowski RM, Tangen CM, Peterson RF, Taylor SA, Rinehart JJ, Eyre HJ et al. (1994). Phase II trial of dimethyltriazenoimidazole carboxamide in patients with metastatic carcinoid. A Southwest Oncology Group study. *Cancer* 73:1505–1508.

- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:2999–3004.
- Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA et al. (2010). The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 467:1109–1113.
- Ceppi P, Volante M, Ferrero A, Righi L, Rapa I, Rosas R et al. (2008). Thymidylate synthase expression in gastroenteropancreatic and pulmonary neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res.* 14:1059–1064.
- Chan AO, Kim SG, Bedeir A, Issa J, Hamilton SR, Rashid A (2003). CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Oncogene* 22:924–934.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33:e179.
- Chen K, Rajewsky N (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 8:93–103.
- Chinot OL, Barrié M, Fuentes S, Eudes N, Lancelot S, Metellus P et al. (2007). Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J. Clin. Oncol.* 25:1470–1475.
- Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM et al. (2006a). Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology* 70:366–377.
- Ciaparrone M, Quirino M, Schinzari G, Zannoni G, Corsi DC, Vecchio FM et al. (2006b). Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology* 70:366–377.
- Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Sjoblom T et al. (2006). The colorectal microRNAome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:3687–3692.
- Diasio RB (1998a). Improving 5-FU with a novel dihydropyrimidine dehydrogenase inactivator. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 12:51–56.
- Diasio RB (1998b). The role of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) modulation in 5-FU pharmacology. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 12:23–27.
- Diasio RB (1999). Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase inhibition. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 13:17–21.
- Diasio RB, Harris BE (1989a). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 16:215–237.
- Diasio RB, Harris BE (1989b). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 16:215–237.
- Diasio RB, Johnson MR (1999). Dihydropyrimidine dehydrogenase: its role in 5-fluorouracil clinical toxicity and tumor resistance. *Clin. Cancer Res.* 5:2672–2673.

- Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G (2003). Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* 9:180–186.
- Drucker E, Krapfenbauer K (2013). Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *The EPMA journal* 4:7.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17:984–992.
- Edler D, Blomgren H, Allegra CJ, Johnston PG, Lagerstedt U, Magnusson I et al. (1997). Immunohistochemical determination of thymidylate synthase in colorectal cancer--methodological studies. *Eur. J. Cancer* 33:2278–2281.
- Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I et al. (2002). Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 20:1721–1728.
- Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B et al. (2000). Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin. Cancer Res.* 6:488–492.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45:228–247.
- Ekeblad S, Sundin A, Janson ET, Welin S, Granberg D, Kindmark H et al. (2007). Temozolomide as Monotherapy Is Effective in Treatment of Advanced Malignant Neuroendocrine Tumors. *Clinical Cancer Research* 13:2986–2991.
- El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbaih A et al. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 133:973–982.
- Elledge SJ, Zhou BS (2000). *Nature* 408:433–439.
- Eriksson B, Skogseid B, Lundqvist G, Wide L, Wilander E, Oberg K (1990a). Medical treatment and long-term survival in a prospective study of 84 patients with endocrine pancreatic tumors. *Cancer* 65:1883–1890.
- Eriksson B, Skogseid B, Lundqvist G, Wide L, Wilander E, Oberg K (1990b). Medical treatment and long-term survival in a prospective study of 84 patients with endocrine pancreatic tumors. *Cancer* 65:1883–1890.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259–269.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V et al. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 343:1350–1354.
- Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature reviews. Drug discovery* 6:734–745.
- Falconi M, Bartsch DK, Eriksson B, Klöppel G, Lopes JM, O'Connor JM et al. (2012). ENETS Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Neoplasms of the Digestive System: Well-Differentiated Pancreatic Non-Functioning Tumors. *Neuroendocrinology* 95:120–134.

- Fidler I (1994). The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79:185–188.
- Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285:1182–1186.
- Freudenberg N, Riede U, Werner M (2009). Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133:1710–1715.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31:13–20.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E et al. (2012). Intra-tumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 366:883–892.
- Gerson SL (1989). Modulation of human lymphocyte O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by streptozotocin in vivo. *Cancer Res.* 49:3134–3138.
- Ghoshal K, Jacob ST (1994). Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res.* 54:632–636.
- Gilbert JA, Adhikari LJ, Lloyd RV, Halfdanarson TR, Muders MH, Ames MM (2013). Molecular Markers for Novel Therapeutic Strategies in Pancreatic Endocrine Tumors. *Pancreas* 42:411–421.
- Goulet B, Baruch A, Moon N, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A et al. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol. Cell* 14:207–219.
- Goulet B, Truscott M, Nepveu A (2006). A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L. *Biol. Chem.* 387:1285–1293.
- Hanahan D (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315:115–122.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.
- Harada R, Dufort D, Denis-Larose C, Nepveu A (1994). Conserved cut repeats in the human cut homeodomain protein function as DNA binding domains. *J. Biol. Chem.* 269:2062–2067.
- Harada R, Vadnais C, Sansregret L, Leduy L, Bérubé G, Robert F et al. (2008). Genome-wide location analysis and expression studies reveal a role for p110 CUX1 in the activation of DNA replication genes. *Nucleic Acids Res.* 36:189–202.
- Häussler B, Albrecht M (2007). Innovationen gestalten den demographischen Wandel. Mit 6 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Schattauer.
- He L, Hannon GJ (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5:522–531.

- Hegi ME, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, Tribolet N de, Weller M et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352:997–1003.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986–994.
- Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349:2042–2054.
- Herrlinger U, Rieger J, Koch D, Loeser S, Blaschke B, Kortmann R et al. (2006). Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. *J. Clin. Oncol.* 24:4412–4417.
- Hofbauer A. Immunhistochemie. <http://www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Hofbauer/DROSI/strentw42.htm> (Jun 22, 2016).
- Höfler H, Kasper M, Heitz PU (1983). The neuroendocrine system of normal human appendix, ileum and colon, and in neurogenic appendicopathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histo-pathol* 399:127–140.
- Holland JF, editor (2000). Cancer medicine. Tumor Angiogenesis. 5th ed. Hamilton, Ontario, New York: B.C. Decker.
- Holohan C, van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13:714–726.
- Holzapfel K, Gärtner F, Rummeny E (2011). Multimodale Bildgebung bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. *Radiologie up2date* 11:355–367.
- Houghton JA, Tillman DM, Harwood FG (1995). Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clin. Cancer Res.* 1:723–730.
- House MG, Herman JG, Guo MZ, Hooker CM, Schlick RD, Lillemoe KD et al. (2003). Aberrant Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Pancreatic Endocrine Neoplasms. *Transactions of the ... Meeting of the American Surgical Association* 121:117–126.
- Hu YC, Komorowski RA, Graewin S, Hostetter G, Kallioniemi O, Pitt HA et al. (2003). Thymidylate synthase expression predicts the response to 5-fluorouracil-based adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 9:4165–4171.
- Huang CL, Yokomise H, Kobayashi S, Fukushima M, Hitomi S, Wada H (2000). Intratumoral expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy. *Int. J. Oncol.* 17:47–54.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 6:279–284.
- Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K et al. (2000). Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Messenger RNA Levels in Gastric Cancer. Possible Predictor for Sensitivity to 5-Fluorouracil. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:105–112.
- Jakob J, Hille M, Sauer C, Ströbel P, Wenz F, Hohenberger P (2012). O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) Promoter methylation is a rare event in soft tissue sarcoma. *Radiat Oncol* 7:180.

- Jakobovitz O, Nass D, DeMarco L, Barbosa AJ, Simoni FB, Rechavi G et al. (1996). Carcinoid tumors frequently display genetic abnormalities involving chromosome 11. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3164–3167.
- Jann H, Roll S, Couvelard A, Hentic O, Pavel M, Müller-Nordhorn J et al. (2011). Neuroendocrine tumors of midgut and hindgut origin: Tumor-node-metastasis classification determines clinical outcome. *Cancer* 117:3332–3341.
- Jensen RT (1999). Pancreatic endocrine tumors: recent advances. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 10 Suppl 4:170–176.
- Jiang W, Lu Z, He Y, Diasio RB (1997). Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in hepatocellular carcinoma: implication in 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 3:395–399.
- Johnston PG, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ (1992). Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res.* 52:4306–4312.
- Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC et al. (1994). The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 12:2640–2647.
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV et al. (1995). Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 55:1407–1412.
- Johnston PG, Mick R, Recant W, Behan KA, Dolan ME, Ratain MJ et al. (1997). Thymidylate synthase expression and response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:308–313.
- Johnston SJ, Ridge SA, Cassidy J, McLeod HL (1999). Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 5:2566–2570.
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 321:1801–1806.
- Kanamaru R, Kakuta H, Sato T, Ishioka C, Wakui A (1986). The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 17:43–46.
- Kedinger V, Sansregret L, Harada R, Vadnais C, Cadieux C, Fathors K et al. (2009). p110 CUX1 homeodomain protein stimulates cell migration and invasion in part through a regulatory cascade culminating in the repression of E-cadherin and occludin. *J. Biol. Chem.* 284:27701–27711.
- Kim EC, Lau JS, Rawlings S, Lee AS (1997). Positive and negative regulation of the human thymidine kinase promoter mediated by CCAAT binding transcription factors NF-Y/CBF, dbpA, and CDP/cut. *Cell Growth Differ.* 8:1329–1338.
- Kloppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, KOMMINOTH P (2007). Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 451 Suppl 1:S9-27.
- Klöppel G. Insulinome - Vortrag bei der SeAP-IAP.

- Klöppel G, Perren A, Heitz PU (2004). The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014:13–27.
- Kouvaraki MA, Ajani JA, Hoff P, Wolff R, Evans DB, Lozano R et al. (2004). Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced and metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 22:4762–4771.
- Krug S, Kuehnemuth B, Griesmann H, Neesse A, Muehlberg L, Boch M et al. (2014). CUX1 - a modulator of tumour aggressiveness in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr. Relat. Cancer.*
- Kubota T (2003). 5-fluorouracil and dihydropyrimidine dehydrogenase. *Int. J. Clin. Oncol.* 8:127–131.
- Kulke MH, Hornick JL, Fraumeni C, Hooshmand S, Ryan DP, Enzinger PC et al. (2009). O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res.* 15:338–345.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401–1414.
- Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A et al. (2013). Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.* 9:e1003225.
- Lee AJX, Endesfelder D, Rowan AJ, Walther A, Birnbak NJ, Futreal PA et al. (2011). Chromosomal Instability Confers Intrinsic Multidrug Resistance. *Cancer Res.* 71:1858–1870.
- Lee HS, Chen M, Kim JH, Kim WH, Ahn S, Maeng K et al. (2014). Analysis of 320 gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors identifies TS expression as independent biomarker for survival. *Int. J. Cancer*:n/a.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415–419.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K, Lee S, Baek SH et al. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23:4051–4060.
- Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R et al. (1998). p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin. Cancer Res.* 4:1243–1250.
- Leotlela PD, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Thakker RV (2003). Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. *Endocr. Relat. Cancer* 10:437–450.
- Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH et al. (2013a). MicroRNA Array Analysis Finds Elevated Serum miR-1290 Accurately Distinguishes Patients with Low-Stage Pancreatic Cancer from Healthy and Disease Controls. *Clinical Cancer Research* 19:3600–3610.
- Li S, Essaghiri A, Martijn C, Lloyd RV, Demoulin J, Öberg K et al. (2013b). Global microRNA profiling of well-differentiated small intestinal neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 26:685–696.

- Li S, Moy L, Pittman N, Shue G, Aufiero B, Neufeld EJ et al. (1999). Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *J. Biol. Chem.* 274:7803–7815.
- Liu L, Gerson SL (2006). Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 12:328–331.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402–408.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3:330–338.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838.
- Lu ZH, Zhang R, Diasio RB (1992). Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J. Biol. Chem.* 267:17102–17109.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95–98.
- Luzi E, Brandi ML (2011). Are microRNAs involved in the endocrine-specific pattern of tumorigenesis in multiple endocrine neoplasia type 1? *Endocr Pract* 17 Suppl 3:58–63.
- Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, Vecchis L de (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol. Res.* 56:275–287.
- Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Grivicich I, Garcia-Santos D, Chies JAB et al. (2009). 5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J Appl Toxicol* 29:308–316.
- McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K et al. (1998). Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *British journal of cancer* 77:461–465.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A (2004). High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39:167–169.
- Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, Liechti A, Weier M, Guschanski K et al. (2013). Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Res.* 23:34–45.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 1:882–891.
- Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulsom R et al. (2005). CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7:521–532.
- Middleton MR, Lunn JM, Morris C, Rustin G, Wedge SR, Brampton MH et al. (1998). O6-methylguanine-DNA methyltransferase in pretreatment tumour biopsies as a predictor of response to temozolomide in melanoma. *Br J Cancer* 78:1199–1202.

- Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, Herder WW de, Thakker RV et al. (2008). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol.* 9:61–72.
- Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M, Eick G (2007). Siegfried oberndorfer and the evolution of carcinoid disease. *Arch Surg* 142:187–197.
- Moertel CG, Hanley JA, Johnson LA (1980). Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 303:1189–1194.
- Moertel CG, Lefkopoulo M, Lipsitz S, Hahn RG, Klaassen D (1992). Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 326:519–523.
- Monica V, Scagliotti GV, Ceppi P, Righi L, Cambieri A, Lo Iacono M et al. (2009). Differential Thymidylate Synthase Expression in Different Variants of Large-Cell Carcinoma of the Lung. *Clin. Cancer Res.* 15:7547–7552.
- Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C et al. (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur. J. Cancer* 43:935–946.
- Moon NS, Rong Zeng W, Premdas P, Santaguida M, Bérubé G, Nepveu A (2002). Expression of N-terminally truncated isoforms of CDP/CUX is increased in human uterine leiomyomas. *Int. J. Cancer* 100:429–432.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L et al. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16:720–728.
- Murken J (2011). Taschenlehrbuch Humangenetik. 96 Tabellen. 8th ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Nagasaki T, Tsuchiya T, Tagawa T, Honda S, Yamasaki N, Miyazaki T et al. (2010). Analysis of 5-fluorouracil-related enzymes in pulmonary neuroendocrine carcinoma: differences in biological properties compared to epithelial carcinoma. *Clin Lung Cancer* 11:412–422.
- Neufeld G, Kessler O (2006). Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 25:373–385.
- Newell D, Gescher A, Harland S, Ross D, Ruddy C (1987). N-methyl antitumour agents. A distinct class of anticancer drugs? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 19:91–102.
- Nishio H, Walsh MJ (2004). CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11257–11262.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* 1:1559–1582.
- Oberg K (2002). Carcinoid tumors: molecular genetics, tumor biology, and update of diagnosis and treatment. *Curr Opin Oncol* 14:38–45.
- Oberg K, Castellano D (2011). Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 30 Suppl 1:3–7.

- Oi K, Makino M, Ozaki M, Takemoto H, Yamane N, Nakamura S et al. (2004). Immunohistochemical dihydropyrimidine dehydrogenase expression is a good prognostic indicator for patients with Dukes' C colorectal cancer. *Anticancer Res.* 24:273–279.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET et al. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Clin. Oncol.* 5:649–655.
- Omura K (2003). Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity in 5-FU-based chemotherapy: mutations in the DPD gene, and DPD inhibitory fluoropyrimidines. *Int. J. Clin. Oncol.* 8:132–138.
- Ormanns S (2014). Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms. *Trillium Krebsmedizin* 23.
- O'Toole D, Couvelard A, Rebours V, Zappa M, Hentic O, Hammel P et al. (2010a). Molecular markers associated with response to chemotherapy in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrine Related Cancer* 17:847–856.
- O'Toole D, Couvelard A, Rebours V, Zappa M, Hentic O, Hammel P et al. (2010b). Molecular markers associated with response to chemotherapy in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* 17:847–856.
- Panzuto F, Boninsegna L, Fazio N, Campana D, Pia Brizzi M, Capurso G et al. (2011). Metastatic and Locally Advanced Pancreatic Endocrine Carcinomas: Analysis of Factors Associated With Disease Progression. *Journal of Clinical Oncology* 29:2372–2377.
- Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM, Haber B, Beauchamp RD, Karp G et al. (1994). Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 9:83–90.
- Parker JB, Stivers JT (2011). Dynamics of uracil and 5-fluorouracil in DNA. *Biochemistry* 50:612–617.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 321:1807–1812.
- Pavel M, Baudin E, Couvelard A, Krenning E, Öberg K, Steinmüller T et al. (2012). ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology* 95:157–176.
- Perren A, KOMMINOTH P, Heitz PU (2004). Molecular Genetics of Gastroenteropancreatic Endocrine Tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014:199–208.
- Perren A, Schmitt A, Komminoth P, Pavel M (2009). Klassifikation gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren. *Radiologe* 49:198–205.
- Pestalozzi BC, Peterson HF, Gelber RD, Goldhirsch A, Gusterson BA, Trihia H et al. (1997). Prognostic importance of thymidylate synthase expression in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 15:1923–1931.
- Pillai RS (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 11:1753–1761.
- Plöckinger U, Rindi G, Arnold R, Eriksson B, Krenning EP, Herder WW de et al. (2004). Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. A consen-

- sus statement on behalf of the European Neuroendocrine Tumour Society (ENETS). *Neuroendocrinology* 80:394–424.
- Pusztaszeri MP (2006). Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 54:385–395.
- Quarles KA, Sahu D, Havens MA, Forsyth ER, Wostenberg C, Hastings ML et al. (2013). Ensemble analysis of primary microRNA structure reveals an extensive capacity to deform near the Drosha cleavage site. *Biochemistry* 52:795–807.
- Ramanathan RK, Cnaan A, Hahn RG, Carbone PP, Haller DG (2001). Phase II trial of dacarbazine (DTIC) in advanced pancreatic islet cell carcinoma. Study of the Eastern Cooperative Oncology Group-E6282. *Ann. Oncol.* 12:1139–1143.
- Randerath K, Tseng WC, Harris JS, Lu LJ (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res.* 84:283–297.
- Raymond E, Dahan L, Raoul J, Bang Y, Borbath I, Lombard-Bohas C et al. (2011). Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med* 364:501–513.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE et al. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901–906.
- Remmele W, Stegner HE (1987). Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8:138–140.
- Rickes S, Mönkemüller K, Malfertheiner P (2006). Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of pancreatic tumors. *JOP* 7:584–592.
- Rindi G (2010). The ENETS guidelines: the new TNM classification system. *Tumori* 96:806–809.
- Rindi G, Falconi M, Klersy C, Albarello L, Boninsegna L, Buchler MW et al. (2012). TNM Staging of Neoplasms of the Endocrine Pancreas: Results From a Large International Cohort Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 104:764–777.
- Ripka S, König A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Klöppel G et al. (2007). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28:1178–1187.
- Ripka S, Neesse A, Riedel J, Bug E, Aigner A, Poulsom R et al. (2010). CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut* 59:1101–1110.
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S et al. (2006). MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J. Clin. Oncol.* 24:4677–4684.
- Rong Zeng W, Soucie E, Sung Moon N, Martin-Soudant N, Bérubé G, Leduy L et al. (2000). Exon/intron structure and alternative transcripts of the CUTL1 gene. *Gene* 241:75–85.

- Ruebel K, Leontovich AA, Stilling GA, Zhang S, Righi A, Jin L et al. (2010). MicroRNA expression in ileal carcinoid tumors: downregulation of microRNA-133a with tumor progression. *Mod. Pathol.* 23:367–375.
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD et al. (2000). Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin. Cancer Res.* 6:1322–1327.
- Santi DV, Hardy LW (1987). Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-)methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26:8599–8606.
- Scarpa A, Mantovani W, Capelli P, Beghelli S, Boninsegna L, Bettini R et al. (2010). Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Mod Pathol* 23:824–833.
- Schilsky RL (1998). Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 12:13–18.
- Scholzen T, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182:311–322.
- Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD et al. (2006). The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 314:268–274.
- Skalnik DG, Strauss EC, Orkin SH (1991). CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266:16736–16744.
- Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H et al. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:4274–4280.
- Sommer H, Santi DV (1974). Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methyl-enetetrahydrofolate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57:689–695.
- Souliotis VL, Boussiotis VA, Pangalis GA, Kyrtopoulos SA (1991). In vivo formation and repair of O6 in human leukocyte DNA after intravenous exposure to dacarbazine. *Carcinogenesis* 12:285–288.
- Starker LF, Carling T (2009). Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Curr Opin Oncol* 21:29–33.
- Strosberg JR, Cheema A, Weber J, Han G, Coppola D, Kvols LK (2011). Prognostic validity of a novel American Joint Committee on Cancer Staging Classification for pancreatic neuroendocrine tumors. *J. Clin. Oncol.* 29:3044–3049.
- Stumpp P, Fleiter C, Purz S, Kahn T (2013). Diagnostischer Mehrwert der simultanen Ga68-DOTATOC-PET/MRT bei Patienten mit neuroendokrinem Tumor im Vergleich zur PET/CT. *Fortschr Röntgenstr* 185.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10:459–466.

- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352:987–996.
- Sun W (2005). Phase II/III Study of Doxorubicin With Fluorouracil Compared With Streptozocin With Fluorouracil or Dacarbazine in the Treatment of Advanced Carcinoid Tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *Journal of Clinical Oncology* 23:4897–4904.
- Taal BG, Visser O (2004). Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 80 Suppl 1:3–7.
- Tan EH, Tan CH (2011). Imaging of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World J Clin Oncol* 2:28–43.
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L et al. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 92:205–216.
- Tsuji T, Sawai T, Takeshita H, Nakagoe T, Hidaka S, Atsushi Nanashima et al. (2004). Tumor dihydropyrimidine dehydrogenase in stage II and III colorectal cancer: low level expression is a beneficial marker in oral-adjuvant chemotherapy, but is also a predictor for poor prognosis in patients treated with curative surgery alone. *Cancer Lett.* 204:97–104.
- Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Taki T, Sugita K et al. (2003). Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res.* 63:4882–4887.
- Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JAH (2003). Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr. Rev.* 24:600–632.
- Turner NC, Strauss SJ, Sarker D, Gillmore R, Kirkwood A, Hackshaw A et al. (2010). Chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and streptozocin for neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 102:1106–1112.
- van Kuilenburg ABP (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 40:939–950.
- Vicentini C, Fassan M, D'Angelo E, Corbo V, Silvestris N, Nuovo GJ et al. (2014). Clinical Application of MicroRNA Testing in Neuroendocrine Tumors of the Gastrointestinal Tract. *Molecules* 19:2458–2468.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z et al. (2009). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:4402–4407.
- Wang M, Peng J, Yang W, Chen W, Mo S, Cai S (2011). Prognostic analysis for carcinoid tumours of the rectum: a single institutional analysis of 106 patients. *Colorectal Disease* 13:150–153.
- Welin S, Sorbye H, Sebjornsen S, Knappskog S, Busch C, Oberg K (2011). Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy. *Cancer* 117:4617–4622.
- Williams ED, Sandler M (1963). The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1:238–239.

- Wilson PM, Ladner RD, Lenz H (2007). Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 1:237–246.
- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA (2003). The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.* 13:790–795.
- Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE et al. (2008). One Hundred Years After "Carcinoid": Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States. *Journal of Clinical Oncology* 26:3063–3072.
- Yao JC, Phan AT, Jehl V, Shah G, Meric-Bernstam F (2013). Everolimus in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: the clinical experience. *Cancer Res.* 73:1449–1453.
- Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, van Cutsem E et al. (2011). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* 364:514–523.
- Yim K (2012). Everolimus and mTOR inhibition in pancreatic neuroendocrine tumors. *CMAR*:207.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118:57–68.
- Zhang J, Wang J, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang G (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin. Chim. Acta* 411:846–852.
- Zhang K, Wang X, Zhou B, Zhang L (2013). The prognostic value of MGMT promoter methylation in Glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Fam. Cancer* 12:449–458.
- Zhao C, Bachu R, Popovic M, Devany M, Brenowitz M, Schlatterer JC et al. (2013). Conformational heterogeneity of the protein-free human spliceosomal U2-U6 snRNA complex. *RNA* 19:561–573.
- Zollinger RM, Ellison EH (1955). Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. *Ann. Surg.* 142:709-23; discussion, 724-8.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Inzidenz neuroendokriner Neoplasien aufgeschlüsselt nach Ursprungsorgan	11
Abb. 2: Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor des Pankreas: Pankreas mit scharf begrenztem solidem Tumor	12
Abb. 3: Links: pankreatisches duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC). Rechts: neuroendokrine Neoplasie des Pankreas	13
Abb. 4: 5-FU-Metabolismus und Wirkung	17
Abb. 5: Purin	18
Abb. 6: Dacarbazin (DTIC)	18
Abb. 7: DTIC methyliert DNA-Basen	19
Abb. 8: Übersicht der Prozessierung von miRNAs	24
Abb. 9: Wirkweise von MGMT	25
Abb. 10: Stem-loop primer	37
Abb. 11: Schematische Darstellung der Signalverstärkung bei der IHC	42
Abb. 12: Immunoblot der zur Injektion verwendeten Zellklone	47
Abb. 13: Exemplarische Xenograft-Tumoren	48
Abb. 14: Immunoblot von Tumorproteinlysat zur Bestätigung der CUX1-Überexpression	48
Abb. 15: Tumolvolumen bei Exstirpation	49
Abb. 16: Zwei exemplarische Ausschnitte zweier immunhistochemischer Färbungen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 in einem CUX1-überexprimierenden Xenograft (links) und einem Wildtyptumor	49
Abb. 17: Proliferationsindex Ki-67	50
Abb. 18: Zwei exemplarische Übersichtsfärbungen mit rot umrandeten Nekrosearealen, deren Größe so bestimmt werden kann	50
Abb. 19: Nekroseareale	51
Abb. 20: Exemplarische immunhistochemische Färbungen gegen CD31	51
Abb. 21: Exemplarische immunhistochemische Färbungen gegen CUX1 in humanen PNEN	52
Abb. 22: Durchschnittlicher Scorewert für Primärtumoren und Metastasen	53
Abb. 23: CUX1-IRS in Korrelation mit dem Proliferationsindex Ki-67	54
Abb. 24: CUX1-IRS in Korrelation mit dem progressionsfreien Überleben (PFS)	55
Abb. 25: CUX1-IRS in Korrelation mit dem Gesamtüberleben (OS)	56

Abb. 26: Durchschnittlicher Scorewert für Gewebeproben von Patienten unter Krankheitskontrolle (DCR) und ohne Krankheitskontrolle (no-DCR).....	57
Abb. 27: Immunoblot der beim Profiling verwendeten Zellklone	58
Abb. 28: Expression der miR-885-5p (1), miR-302c (2), miR-1296 (3) und miR-564 (4) in drei biologischen Replikaten (a, b, c).....	60
Abb. 29: CUX1-Knockdown nach 48 h und 72 h	62
Abb. 30 Immunoblot der Proteinlysate von CUX1-Knockdown Zellen	62
Abb. 31: MiRNA-Expression von miR-885-5p (1), miR-302c (2), miR-1296 (3) und miR-564 (4) in CUX1-Knockdown Bon1-Zellen 48 (a) und 72 (b) Stunden nach der Transfektion.....	64
Abb. 32: mRNA-Expression von TS (1), DPD (2) und MGMT (3) in Wildtyp und in CUX1-überexprimierenden Bon1-Zellen	67
Abb. 33: mRNA-Expression von TS (1), DPD (2) und MGMT (3) in Bon1-Zellen 48 Stunden nach CUX1-Knockdown mit siCUX1-4 Oligonukleotid	68
Abb. 34: Flussdiagramm zur Darstellung der retrospektiven Patientenrekrutierung	70
Abb. 35: Repräsentative Schnitte der MGMT-gefärbten Schnitte	70
Abb. 36: Flussdiagramm zur Darstellung der retrospektiven Patientenrekrutierung	73
Abb. 37: Repräsentative Schnitte der gegen DPD (oben) und TS (unten) gefärbten Schnitte.....	74

Alle Abbildungen ohne Angabe einer Quelle sind vom Autor erstellt worden.

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien nach WHO	12
Tab. 2: Laborgeräte	29
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	30
Tab. 4: Kits	32
Tab. 5: Puffer	32
Tab. 6: Material für die Zellkultur	33
Tab. 7: Zelllinien	33
Tab. 8: Trenngel	35
Tab. 9: Sammelgel	35
Tab. 10: Small interfering RNA (siRNA)	37
Tab. 11: Formel für die Expressionsanalyse	38
Tab. 12: MiRNA-spezifische cDNA-Primer	39
Tab. 13: CDNA-Synthese-Primer	39
Tab. 14: QRT-PCR Primer	40
Tab. 15: Antikörper	43
Tab. 16: Färbeintensität (FI)	44
Tab. 17: Prozent positiver Zellen (PPZ)	44
Tab. 18: Die im Profiling identifizierten, differenziell regulierten miRNAs	59
Tab. 19: Mittelwerte der drei biologischen Replikate	61
Tab. 20: Expression der miRNAs relativ zu siK	65
Tab. 21: Relative Expression: Ratio von CUX1/WT	67
Tab. 22: MGMT-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation	71
Tab. 23: Korrelation der MGMT-Expression mit klinischem Ansprechen	72
Tab. 24: Korrelation der DPD-Expression zum klinischen Ansprechen	75
Tab. 25: Korrelation der TS-Expressionshöhe zu klinischen Ansprechen	75

10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-FU	5-Fluorouracil
ABC	Avidin-Biotin-Complex
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementär DNA
CgA	Chromogranin A
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle Threshold
CT	Computertomographie
CUX1/CUTL1/CDP	Cut-like Homeobox 1
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCR	Disease control rate
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxorubicin
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTIC	Dacarbazin
dTMP	Desoxyuridintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reagenz
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylen-Diamin Tetraacetat
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
FA	Funktionell-aktiv
FCS	fetal calf serum
FdUTP	Fluorodesoxyuridintriphosphat
FI	Färbeintensität
FNA	Funktionell-nicht-aktiv
FUMP	Fluorouridinmonophosphat
FUTP	Fluorouridintriphosphat
g	Gramm
GEP-NEN	Gastro-entero-pankreatische Neuroendokrine Neoplasie

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O	Diwasserstoffoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPF	High power field
HRP	Horse Radish Peroxidase
i.v.	Intravenös
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunoreaktiver Score
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LCNEC	Large cell neuroendocrine carcinoma
LOH	Loss of heterozygosity
M	Mol
MANEC	Mixed Adenoneuroendocrine Carcinoma
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MGMT	Methylguaninmethyltransferase
Min.	Minuten
miRNA/miR	micro RNA
miRNP	micro RNA ribonucleoprotein
miRSC	micro RNA ribonucleoprotein complex
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Multi-Tissue-Arrays
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphat
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumdiphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumor
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Oligo dT	15–25 Desoxythymidin
ORR	Objective response rate
OS	Overall survival
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PFS	Progression free survival
PNEN	Pankreatische Neuroendokrine Neoplasie
PP	Pankreatisches Polypeptid

Abkürzungsverzeichnis

PPZ	Prozent positiver Zellen
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PRRT	Peptidrezeptorvermittelte Radiotherapie
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese
snRNA	Small nuclear RNA
SSR	Somatostatin-Rezeptor
STZ	Streptozotizin
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X	Alkylphenylpolyethylenglykol
TS	Thymidylat-Synthase
U	Unit
UK	Uridin Kinase
UP	Uridin Phosphorylase
V	Volt
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
w/v	weight/volume
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZES	Zollinger-Ellison Syndrom

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg: Bartsch, Baum, Becker, Bien, Bohlander, Burchert, Cetin, Czubayko, Del Rey, Daut, Dodel, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Greulich, Gress, Hertl, Heverhagen, Hofmann, Höffken, Holst, Hoyer, Hundt, Kann, Kill, Kircher, Klose, Kolb-Niemann, König, Koolmann, Kühnert, Kühne, Krug, Kruse, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Michl, Meissner, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Leonhardt, Neubauer, Nikolaizik, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Printz, Ramaswamy, Renz, Riera-Knorrenschild, Richter, Rosenow, Rucholtz, Sahmland, Schäfer, Schäfer, Seitz, Sekundo, Sevinc, Steiniger, Steinkamp, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Werner, Weihe, Wulf, Zemlin

In London, Vereinigtes Königreich: Hoque, Smith, Preston

In Winterthur, Schweiz: Breitenstein, Meyer

In München: Zwißler, Czerner

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Matthias Gress für die Möglichkeit danken, die Arbeit an der Klinik für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel des Universitätsklinikums Marburg durchzuführen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Patrick Michl für die spannende Aufgabenstellung und die engagierte Unterstützung sowie seine wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Sebastian Krug, der mich über den gesamten Zeitraum meiner Promotion mit sehr großem Einsatz unterstützt hat. Auch die über die Doktorarbeit hinausgehenden gemeinsamen Projekte haben mir immer viel Spaß gemacht. Vielen Dank für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Daneben danke ich allen Mitarbeitern der AG Michl, insbesondere Dr. Benjamin Kühnemuth und Dr. Leonie Mühlberg sowie Dr. Heidi Griesmann, Claudia Weiss, Eleni Aprin und Rami Abassi für ihre konstruktiven Anregungen, ihre Kritik und Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön an die Mitarbeiter der Forschungslabore von Prof. Ellenrieder und Prof. Buchholz für das kollegiale Miteinander und den Gedankenaustausch.

Ebenso danke ich Dr. Wilhelm Nimphius und Viktoria Wischmann von der Abteilung für Pathologie.

Vielen Dank an meine Mutter Eva und meinen Bruder Johannes für das Korrekturlesen und ihre sehr hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die mir meinen bisherigen Werdegang ermöglicht hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht.